

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG
DER WUNDHEILUNG DURCH DTIC

UTE NIXDORF

Diss. München
1984

AUS DER DERMATOLOGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR : PROF. DR. MED. OTTO BRAUN-FALCO

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG
DER WUNDHEILUNG DURCH DTIC

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

UTE NIXDORF

AUS

MÜNCHEN

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr.med. Dr.h.c. O. Braun-Falco

Mitberichterstatter :

Dekan : Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 28.2.1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
- Theorie der adjuvanten Chemotherapie	3
- Prognosekriterium beim malignen Melanom: Der "high risk"-Patient	7
- DTIC: Parmakologie	11
Pharmaokinetik	12
Postulierte Wirkungsmechanismen	13
Nebenwirkungen	15
- Therapieergebnisse mit DTIC beim metastasierenden malignen Melanom	16
- DTIC In der adjuvanten, postoperativen Therapie des malignen Melanoms	17
- Die Wundheilung und ihre Störungen	19
2. VERSUCHSAUFBAU	22
- Wundmodell	22
- Methodik	23
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	26
- Versuchsanordnung	26
- DTIC-Dosierung	26
- Ergebnisse	31
- Meßergebnisse	32
- Auswertung der bakteriellen Besiedlung	36

	Seite
4. DISKUSSION	42
- Wundmodell	42
- Dosisabhängigkeit und Applikationsform	44
- Applikationsschema	45
- Gesunde Ratten als Versuchstiere - Übertragbarkeit der Ergebnisse auf tumorkranke Menschen	46
- Tierexperimentelle Studien über den Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung	46
- Ergebnisse	47
- Klinisch-adjuvante Studien über den Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung beim Menschen	53
- Schlußbetrachtung	55
LITERATURVERZEICHNIS	60

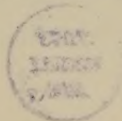
1. EINLEITUNG

=====

Die Entwicklung der antineoplastischen Chemo-Therapeutika, die in den USA während des 2. Weltkrieges mit der Entdeckung der zytostatischen Potenz des Stickstoff-Lost begann, erweiterte die Behandlungsmöglichkeiten sehr vieler maligner Tumoren und brachte in den letzten Jahren bei einigen, insbesondere kindlichen Tumoren wie Wilm's Tumor oder ALL (akute lymphatische Leukämie), erste Dauerheilungen (126).

Bei der Behandlung des malignen Melanoms jedoch, auf das trotz des niedrigen Anteils von 3 % aller bösartigen Hautgeschwülste zwei Drittel der Todesfälle durch Hautkrebs zurückgehen (69), zeigte keines der angewendeten Zytostatika "entscheidende Wirkungen" (70) bei der Behandlung der meist aussichtslosen Spätfälle. Sogar eine Beschleunigung des letalen Ausgangs durch Zusammenbruch der Immunabwehr wurde nach Beobachtung von Einzelfällen für möglich gehalten (63). Erst das 1959 im Rahmen eines NCI-Forschungsprogrammes (amerik. National-Cancer-Institut) synthetisierte DTIC brachte ab 1970 in den verschiedenen klinischen Tests durchgehend Ansprechquoten von 18 - 33 % beim metastasierenden malignen Melanom (139, 78, 92, 18, 86).

Seit Handley 1907 (zitiert bei 11) die weite Exzision und Lymphknotendissektion als Primärbehandlung des malignen Melanoms propagierte, ergab sich über Jahrzehnte keine neue Behandlungsmöglichkeit dieses aggressiven Tumors. Nachdem, wohl eher durch die verbesserte Früherkennung als durch veränderte Therapie, die 5-Jahres-Überlebensquoten von 41 % 1940-49 auf 67 % im Jahre 1965-69 (20) in einer englischen Studie stiegen, ist eine weitere Verbesserung ohne Einführung neuer Behandlungsmodi nicht zu erwarten.



Da aber selbst etwa 35 - 49 % aller Patienten, die im Stadium I (lokalisierte Erkrankung ohne LK-Metastasen) primär behandelt werden (132, 3), Metastasen entwickeln und letztlich an dem malignen Melanom sterben, müssen zum Zeitpunkt der chirurgischen Entfernung des Primärtumors bereits klinisch stumme Mikrometastasen bestehen (6, 109). Damit stellte sich die Frage nach einer peri- oder postoperativen adjuvanten Chemotherapie, um die vorher chirurgisch stark verminderte Tumorzellmasse - eventuell kurativ - weiter zu reduzieren (37). Seit 1974 läuft im Rahmen einer multizentrischen prospektiven Studie in der Dermatologischen Klinik der LMU-München eine klinische, adjuvante Behandlung von Melanompatienten, die eine Chemotherapie mit einer unspezifischen Immuntherapie kombiniert. Begonnen wird die Behandlung bei sogenannten "high risk"-Patienten ungefähr 2 - 3 Wochen nach der Resektion des malignen Melanoms. Die operative Behandlung mit einer Exzision 3 - 5 cm dreidimensional im Gesunden schafft große Wundflächen, die meist durch autologe Spalthauttransplantate gedeckt werden müssen. Geht man von der Theorie adjuvanter Chemotherapie aus (siehe unten) so erscheint ein möglichst frühzeitiger Einsatz der Zytostatika am erfolgversprechendsten. Dies könnte jedoch die Wundheilung beeinträchtigen und zu lokalen Komplikationen führen.

Die Untersuchung anderer Zytostatika in tierischen Wundheilungsmodellen und klinische Beobachtungen über den Zusammenhang von adjuvanter Chemotherapie und Wundheilungsstörungen ergaben keine übereinstimmenden Ergebnisse (121).

In den meisten Wundheilungsmodellen wird als Maß für das Heilen der Wunde die Zunahme ihrer Reißfestigkeit bestimmt. Diese Modelle gehen von nahtadaptierten Inzisionswunden aus und haben für die großflächige, mit einem Spalthauttransplantat gedeckte Wunde nach einer Melanomentfernung

weniger Bedeutung. Wir verwendeten daher ein von Rudas 1960 (110) entwickeltes Wundmodell, das einer modifizierten offen granulierenden Wunde entspricht, indem es die Komponenten Wundkontraktion und Epithelialisierung mit einem Kunstgriff ausschließt. Anhand des Parameters "Granulationsgewebsbildung" untersuchten wir den Einfluß von DTIC auf die Wundheilung bei Ratten.

Theorie der adjuvanten Chemotherapie

Chemotherapeutika sind definiert als Substanzen, die beim Menschen und anderen Lebewesen imstande sind, Neoplasien im Wachstum zu hemmen, zu verkleinern oder zu zerstören (99). Bis heute ist es unmöglich, mit den zur Verfügung stehenden Substanzen spezifisch nur Tumorzellen zu treffen, sondern man wird immer auch Wirtszellen schädigen. Dabei sind besonders betroffen die Wechselgewebe, d.h. Haut und Schleimhäute, die Blutzellen und Gameten, welche mit ihren hohen Mitoseraten ebenso wie die malignen Tumoren empfindlich gegen die auf unterschiedliche Weise zellstoffwechsel- oder zellschädigenden Zytostatika sind: 1943 wurde der erste Hodgkin-Lymphom-Patient mit Stickstoff-Lost, einem Alkylans, behandelt (42). Innerhalb weniger Jahrzehnte wurde eine Vielzahl weiterer antineoplastischen Substanzen entwickelt. Heute unterscheidet man nach biochemischen Gesichtspunkten 3 Hauptgruppen: Alkylantien, Antimetabolite und Mitosehemmer. Dazu kommen Hormone, Enzyme sowie in neuerer Zeit Versuche, durch Stärkung der körpereigenen Abwehr Tumorzellen zu vernichten, wobei diese Immuntherapie mit der Chemotherapie häufig kombiniert wird (40, 106).

Während die herkömmliche Therapie maligner Tumoren nach

der möglichst radikal-kurativen Entfernung des Primärtumors durch Chirurgie oder Bestrahlung bis auf das Auftreten von Metastasen wartet, um diese ihrerseits durch Strahlen, chirurgisch oder chemotherapeutisch anzugehen (8), folgt die adjuvante Chemotherapie solider Tumoren einem anderen Konzept. Dieses geht von zwei Voraussetzungen aus:

1. Nach Auftreten von Metastasen gibt es in den seltensten Fällen noch Heilungen.
2. Die Rückfälle nach Entfernung des Primärtumors gehen auf Mikrometastasen zurück, die zur Zeit der Erstbehandlung bereits bestehen.

Anders als bei der chirurgischen Behandlung maligner Tumoren, bei der die Absiedlung von Metastasen und nicht die Masse oder Ausdehnung des Primärtumors limitierend ist, spielt bei der Chemotherapie nicht der Grad der Ausbreitung, sondern die Menge lebensfähiger Tumorzellen eine erfolgsbegrenzende Rolle (8). Der Grund dafür ist, daß die meisten Chemotherapeutika nach einer Kinetik 1. Ordnung wirken, d.h. maximal 99,99 % der Krebszellen töten. Das bedeutet bei einer Metastase von 100 Zellen den Tod aller Zellen, bei einer Metastase von 10 g (ungefähr 10^{10} Zellen entsprechend) jedoch, daß 10 Millionen lebensfähige Zellen überleben und höchstens eine geringe Verzögerung des Metastasenwachstums eintritt. Klinisch gerade diagnostizierbare Absiedlungen mit einer Mindestgröße von 1 cm³ bedeuten demnach chemotherapeutisch bereits große, schwer angehbare Tumorzellmassen. Diese Tatsache legt die frühzeitige Behandlung noch sehr kleiner, klinisch stummer Metastasen nahe. Schabel (117) wies bei Mäusen nach, daß B16 Melanome geheilt werden können, wenn am 12. Tag nach Inokulation gleichzeitig mit der chirurgischen Entfernung des Tumors ME-CCNU (Methyl-1-(2-Chloroäthyl)3-cyclohexal-1-nitrosourea) gegeben wird, wäh-

rend spätere Zytostatikagabe nur noch palliativ wirkt. Eine weitere theoretische Überlegung ist, daß während der Operation Tumorzellen verschleppt oder durch Manipulation des Tumor abgelöst und in Gefäße eingeschwemmt werden können. Schmäh wies z.B. bei einer großen Zahl von Mammacarcinom-Patienten postoperativ Tumorzellen im strömenden Blut nach (118).

Daraus ist zu schließen, daß adjuvante Therapie möglichst frühzeitig, evtl. bereits perioperativ erfolgen sollte.

Von großer Wichtigkeit erweisen sich tumorzellkinetische Überlegungen, um den Effekt eines bestimmten Zytostatikums auf einen bestimmten Tumor zu verstehen (56). Verschiedene Malignome haben, bei sehr ähnlichen Zellzykluszeiten ($1/2 - 5$ Tage), sehr unterschiedliche Tumorverdopplungszeiten (10 - 1000 Tage) (119). Während also die Zellzykluszeit nur einen untergeordneten Einfluß haben dürfte, scheint der Tumorzellverlust durch Absterben, Absiedlung und Exfoliation sowie - wohl als Hauptfaktor - die "Growth fraction" entscheidend zu sein. Unter "Growth fraction" versteht man in einem 3-Kompartmentsystem das Kompartiment A, welches die in einer der Zellzyklusphasen G_1 , S, G_2 , M befindlichen, sich aktiv teilenden Tumorzellen bezeichnet. Kompartiment B bedeutet Zellen, die sich in der G_0 -Phase befinden, also vorübergehend ruhende, jedoch aktivierbare Zellen. Kompartiment C enthält Tumorzellen, die zur Masse beitragen, aber keine proliferative Potenz mehr besitzen. Für die Chemotherapie von Bedeutung sind nur A und B.

Die von Schabel (116) gemachte Beobachtung, daß mit Zunahme der Tumorgröße die Tumorverdopplungszeit zunimmt (der Tumor langsamer wächst), führte dieser auf das relative Anwachsen des B- und C-Kompartments gegenüber dem teilungsaktiven A-Kompartiment bei Alterung des Tumors zurück. Mathematisch besteht nur in den frühen Tumorstadien

ein exponentielles Wachstum, später flacht die Kurve zu der sogenannten "Gompertzian-Funktion" ab.

Bezüglich der verschiedenen Chemotherapeutika besteht die wichtige Unterscheidung zwischen zellzyklusspezifischen (CCS) und zellzyklusunspezifischen Substanzen (CCNS). Zellzyklus-spezifische Zytostatika wirken nur auf sich aktiv teilende Zellen, so z.B. Ara-C (Arabinosylcytosin) als DNA-Polymerase-hemmer (126), auf die frühe Synthesephase: Es werden nur die Zellen des A-Kompartements getroffen, die sich gerade in der frühen S-Phase befinden. Das setzt für den Erfolg bei der Anwendung von CCS-Zytostatika voraus, daß der Tumor eine hohe Growth fraction hat, da sonst die wirtseigenen, schnell-proliferierenden Zellen mehr als der Tumor geschädigt werden. Die CCNS-Substanzen dagegen, zu denen die Alkylantien gehören, schädigen das gesamte A-Kompartement (evtl. auch teilweise das B-Kompartement (119)) und aktivieren als Folge ruhende B-Kompartement-Tumorzellen, die mit dem nächsten Behandlungszyklus erreicht werden als jetzt sich aktiv teilende Zelle. Bei der Rekrutierung von Zellen aus dem B-Kompartement erscheint in bestimmten Fällen als 2. Schritt eine CCS-Anschlußtherapie als sinnvoll (117, 119).

Bezogen auf die Fragestellung der adjuvanten Chemotherapie beim malignen Melanom ergibt sich folgendes:

Das von uns untersuchte DTIC gehört zu den zellzyklusunspezifischen Drogen und schädigt wahrscheinlich als Alkylans Makromoleküle wie DNA, RNA und Proteine.

Shirakawa (125) fand beim MM eine S-Phasen-Dauer von 24 Stunden, eine Zellzykluszeit von 3 - 4 Tagen und - als bedeutendsten Indikator für die Tumorverdopplungszeit - eine Growth fraction von nur 25 %, neben einer spontanen Zellverlustrate von 70 %. Damit gehört das maligne Melanom in die Gruppe der Tumoren mit kleiner Growth fraction, bei denen die Verdopplungszeit 1 Woche oder mehr beträgt (48). Folglich kommen für die Behandlung des malignen Melanoms primär CCNS-Zytostatika in Frage, etwa auch DTIC.

Ferner gehört das maligne Melanom zu den Tumorarten, deren Primärtumormasse chirurgisch meist soweit verkleinert werden kann, daß Zytostatika überhaupt in der Lage sind, eine lebensverlängernde weitere Tumorzellreduktion zu erreichen (48). Für eine adjuvante Chemotherapie beim malignen Melanom spricht auch die sich von anderen Tumoren unterscheidende Absterbekurve (79, 54), welche die Annahme endgültiger Heilung nicht nach 5, sondern erst nach 10 Jahren als sicher erscheinen läßt, da 20 % nach 5 Jahren metastasieren. Aus dieser möglichen späten Metastasierung kann man ableiten, daß evtl. jahrelang ruhende Mikrometastasen zum Zeitpunkt der Primärbehandlung beim malignen Melanom sehr häufig bestehen, auch wenn klinisch das Stadium I vorzuliegen scheint.

Prognosekriterium beim malignen Melanom:

Der "high risk"-Patient

Da Jede antineoplastische Chemotherapie Nebenwirkungen hat - als bedrohlichste die Initiierung von Zweitmalignomen - muß besonders die adjuvante Behandlung mit Zytostatika sich an strengen Kriterien orientieren, um möglichst auszuschließen, daß ein schon chirurgisch geheilter Patient wegen des nur vermuteten Vorhandenseins von Mikrometastasen einer kanzerogenen Substanz ausgesetzt wird. Diese Frage stellt sich beim Melanom-Patienten nur im Stadium I, da nur in diesem eine auf den Primärherd und (evt.) auf lokale Satelliten begrenzte Erkrankungen behandelt wird, die chirurgisch heilbar ist.

Stadium II bedeutet "intransit"-Metastasen und/oder regionalen LK-Befall, während Stadium III als generalisierte Metastasierung definiert ist.

Clark (12) teilte 1969 das maligne Melanom in drei heute

noch gültige Haupt-Typen nach ihrem primären Wachstumsverhalten ein: das SSM (Superfiziell spreitendes Melanom), NM (Naduläres Melanom) und LMM (Lentigo-maligna Melanom). Gleichzeitig postulierte er einen Zusammenhang zwischen der histologischen Eindringtiefe (Level I - V) und der Prognose.

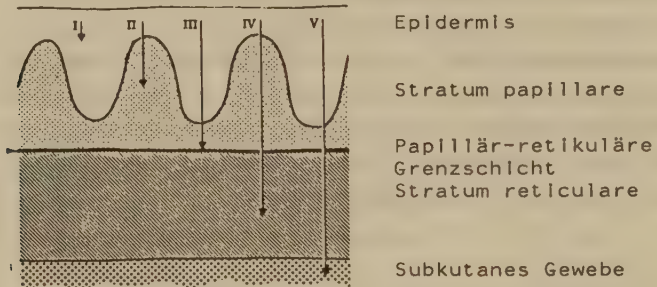


Abb. 1 Histologische Eindringtiefe des malignen Melanoms nach Clark (12)

Daß neben den Invasionsleveln auch die absolute Dicke des Tumors von prognostischer Bedeutung ist, erkannte Breslow (7) 1970. Unterhalb einer Tumordicke von 0,76 haben maligne Melanom-Patienten nur ein minimales Rückfallrisiko. Jedoch fielen auch bei diesem Einteilungsschema relativ viele Patienten in die Gruppe mit mittlerem Metastasierungsrisiko, nämlich die 54,9 %, die eine Tumordicke zwischen 0,76 und 3,0 mm aufwiesen. Schon 1974 wies Braun-Falco (6) auf die Mitosenanzahl in Schnitten von malignen Melanomen als wichtiges Kriterium für die Abschätzung der Metastisierungsgefahr hin. Die Kombination der Breslowschen Tumordicke mit einem definierten Mitoseindex ergab 1978 den von Schmoeckel entwickelten Index (120), der folgendermaßen definiert ist:

Prognost Index = Tumordicke x Mitoseindex
Mitoseindex = maximale Zahl Mitosen/mm² (wobei eine Fläche von 1,0 bis 1,5 mm² untersucht wird)

Als entscheidender Vorteil der Methode erweist sich die Verkleinerung des Patientenkollektivs, das ein mittleres, also individuelle schwer voraussagbares Metastasierungsrisiko hat.

Tabelle 1: Prozentualer Anteil an Melanom-Patienten mit mittlerem Metastasierungsrisiko in unterschiedlichen histologischen Klassifikationen
Mod. nach Schmoeckel (120)

histolog. Tumoreinteilung		% Anteil
Invasionslevel (Clark)	II - IV	86,6 %
Tumordicke (Breslow)	0,76 - 3 mm	54,9 %
Prognost Index (Schmoeckel)	1,0 - 13,0	38,8 %

An der Dermatologischen Klinik der LMU-München werden mit einer adjuvanten Chemotherapie Patienten mit einem prognostischen Index von 6 oder mehr behandelt. In anderen Zentren wird zum Teil noch mit dem Clarkschen oder Breslowschen Schema bzw. mit viele Parameter einschließenden Prognose-schemata die Selektion der "high risk"-Gruppe erarbeitet (137, 57, 1, 143).

Neben diesem wichtigsten histologischen Prognoseparameter scheinen von Bedeutung zu sein (und evtl. in die Überlegung der Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie einzubeziehen):

Tabelle 2: Prognoseparameter beim malignen Melanom, modifiziert nach Everell (31)

Parameter	Signifikanz als Prognosekriterium
Alter	Günstig: Frauen in der Prämenopause
Geschlecht	Günstig : weiblich Ungünstig : männlich
Dauer der Erkrankung vor Diagnosestellung	Ungünstig : Dauer länger als 6 Monate
Ausdehnung	Günstig : kleine Oberfläche Ungünstig : große Oberfläche
Klinischer Typ	Lentigo maligna : günstig Suberfiziell spreitend: mittel Modulär : ungünstig
Invasions-Level	Günstig : I Ungünstig : II, III, IV
Tumordicke	Sehr günstig: weniger als 0,75 mm Günstig : zwischen 0,75 - 1,5 mm Ungünstig : mehr als 1,5 mm
Sitz	Extremitäten: günstig Kopf und Hals: mittel Stamm : ungünstig
Lymphozytäre Infiltration des Tumorgrunde	Günstig : wenn vorhanden Ungünstig : wenn fehlend
Mitosenzahl pro Gesichtsfeld	weniger als 1 : günstig mehr als 1 : ungünstig
Riesenzellen	vorhanden : ungünstig fehlend : günstig
Zelltyp	Rundzellen : ungünstig Spindelzellen : mittel gemischt : günstig
Satelliten	vorhanden : ungünstig fehlend : günstig
Wachstumsrate	Schnell : ungünstig Langsam : günstig
Pigmentierung	Amelanotisch oder wenig Pigment: ungünstig
Ulzeration oder Blutung	Vorhanden : ungünstig Fehlend : günstig

Die von McLeod (84) (1971) beobachtete differierende Absterberate bei Männern (45 %) und Frauen (19,3 %) hängt möglicherweise mit dem bei Frauen bevorzugten Befall der Unterschenkel zusammen, während beim Mann die Rumpfmelanome wesentlich häufiger sind:

Neben allen erwähnten Kriterien, die die Prognose beeinflussen, sollte nicht vergessen werden, daß nach dem Auftreten auch nur einer regionalen Lymphknotenmetastase die 5-Jahres-Überlebensrate auf 5 bis 6 % sinkt (23, 98). Damit stellt das Vorhandensein von Metastasen, klinisch oder subklinisch, den entscheidenden, lebensbegrenzenden Faktor dar.

DTIC: Pharmakologie

DTIC wurde 1959, gefördert vom amerikanischen NCI-Drug Research im Southern Research Institut synthetisiert, als ein Nachfolger ebenfalls wirksamer, aber instabiler Triazenoimidazole und erwies sich als eine Substanz mit antineoplastischer Wirkung auf experimentelle Tiertumoren (122). Bis 1964 waren die vorklinischen Toxizitätsprüfungen abgeschlossen, woraufhin erste klinische Tests begannen. Eingesetzt wird DTIC in der Therapie maligner Lymphome, insbesondere beim M. Hodgkin und den Leukämien (4, 140) sowie bei Weichteil- und Osteosarkomen (64, 65). Als wirksam erwies sich DTIC auch beim metastasierenden malignen Melanom, bei dem in ungefähr 25 % der Fälle temporäre Remissionen induziert werden können (78, 18, 86). 1973 erschien DTIC im Handel und wurde ab 1974 in der Dermatologischen Klinik der LMU-München in einer prospektiven Studie über adjuvante Chemo-Immuno-Therapie beim malignen Melanom eingesetzt.

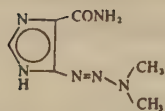


Abb. 2 : Dacarbacin (5-(3,3-Dimethyltriazeno)imidazol-4-carboxamid = DTIC)

Pharmakokinetik

Da die enterale Resorption sehr unsicher ist, wird DTIC üblicherweise parenteral verabreicht (bei Ratten: Intrapertitoneal). Beim Menschen beträgt die Plasma-Halbwertszeit 35 min (47); es besteht keine wesentliche Plasmaproteinbindung. Nach Loo (75) findet sich beim Hund im Liquor nur ein Siebtel der Plasmakonzentration. 40 % der Substanz werden innerhalb von sechs Stunden beim Menschen unverändert, teilweise aktiv tubulär sezerniert (76), ausgeschieden, weitere 20 % erscheinen in Form des wichtigsten Metaboliten AIC im Urin (49).

Neben der renalen Elimination kommt es zum Abbau des selbst unwirksamen DTIC zu wirksamen Metaboliten durch die mikrosomalen Leberenzyme.

Experimentell wurden zwei Hauptabbauwege nachgewiesen, welche bei Licht bzw. Dunkelheit ablaufen, wobei physiologischerweise bei der Anwendung von DTIC wohl beide Wege wirksam werden (77). Bei Licht zerfällt DTIC durch Photodekomposition zu Dimethylamin und DZC (123), einer hochaktiven

Postulierte Wirkungsmechanismen

Folgenden Metaboliten wird eine antineoplastische Wirksamkeit zuerkannt:

DZC:

Nach Skibba (128) ist dieses hochreaktiv und hat als bipolares Molekül große Affinität zu Makromolekülen. Es wirkt als Alkylans, nach Bono DNA selektiv (5).

Methylcarbonium-Ion:

Nach Skibba (127) reagiert dieses als hochaktives, positiv geladenes Alkyl-Radikal mit Nucleinsäuren und methyliert die Guanin-Base (Nachweis beim Menschen durch C14-Guanin-Gabe mit folgender Entstehung von C14-Methylguanin), was zur Spaltung der Desoxyribosidbindung sowie Zwischenstrangvernetzungen mit Interferenz der DNA-Replikation führt.

DMA:

Saunders (113) wies nach, daß dieses gleichzeitig mit DZC entstehende Dimethylamin in Chinese hamster ovary (CHO)-Zellkulturen mit DNA, RNA und Protein reagiert, wahrscheinlich als Alkylans.

Über das Ausmaß des Effekts auf DNA-, RNA- und Proteinsynthese finden sich unterschiedliche Angaben (127, 5, 97), evtl. bedingt durch unterschiedliche Versuchsanordnungen. Neben der Wirkung als

- Alkylans wurde auch postuliert eine
- SH-Interaktion, da Gluthation die DTIC-Wirkung aufheben kann (114)

- de novo Purinsynthese-Hemmung (114).

DTIC besitzt keine Zellzyklusspezifität, d.h. es ist in seiner Wirksamkeit nicht abhängig davon, daß die zu tötende Zelle gerade eine bestimmte Zellzyklusphase durchläuft. Zwar wies Bono (5) eine Arretierung von L1210 Mäuse Leukämie-Zellen in vivo in der G2-Phase nach, aber die immer wieder beobachtete first-order-kinetic Reduktion (142), unter anderem bei L1210 Zellen in vitro (127), spricht gegen eine Zellzyklusspezifität des DTIC, ebenso wie die Einflußlosigkeit der Behandlungsintervalle der verschiedenen Therapie-schemata auf die Behandlungsergebnisse (85).

Nebenwirkungen

Die konstanteste Nebenwirkung, besonders nach Erstapplikation, besteht in Übelkeit und Erbrechen, eine bis zwei Stunden nach i.v.-Gabe beginnend und ungefähr 12 Stunden anhaltend (47), weswegen meist Phenothiazine mitverabreicht werden.

Nach Hall und Loo (49) entwickeln 20 % der behandelten Patienten zwei Wochen nach Therapiebeginn eine Myelosuppression, insbesondere eine Leuko- und Thrombopenie, von der sie sich in der Regel innerhalb von drei bis vier Wochen erholen.

Luce (80) wies 1970 auf ein grippeähnliches Syndrom mit Fieber und Gliederschmerzen und auf die Hepatotoxizität hin, die bei vielen Patienten zu einer GOT-Erhöhung führt, seltener zu Anstiegen des Bilirubins. Runne (111) beschreibt ein Budd-Chiari-Syndrom, Sutherland (130) Leberschäden unter Dacarbacintherapie.

DTIC wirkt nur schwach immunsuppressiv (55). Jedoch könnte eine spezifische Hemmung der Synthese tumorassoziierter Antigene beim malignen Melanom von Bedeutung sein (92). Dem-

gegenüber hält Nicolin (94) eine Erhöhung der Immunogenität von malignen Melanom-Zellen durch DTIC für möglich. Ferner wurde von Skibba (129) bei Anwendung von 740 mg/Ratte für 14 Wochen die Induktion von Alveolarzelltumoren und Lymphosarkomen nachgewiesen, was sich mit der Beobachtung der Kanzerogenität des Methylcarbonium-Ions bei Preussmann (103) deckt.

Therapieergebnisse mit DTIC beim metastatischen malignen Melanom

DTIC erwies sich in der Behandlung des disseminierten malignen Melanoms als das Zytostatikum mit den höchsten Ansprechquoten, welche in den verschiedenen Studien in relativ engen Grenzen von 16 bis 31 % variieren (92, 78, 139, 18, 86). Von den "Respondern" entwickeln 5 bis 6 % eine Vollremission, die als klinische Totalregression eines Tumors und aller Metastasen definiert ist, während die übrigen der Therapieerfolge eine Teilremission bedeuten (d.h. 50 %ige Verminderung der nachweisbaren Gesamttumormasse für mindestens einen Monat). Spricht ein Patient auf die Chemotherapie an, bedeutet das eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von 2,8 bis 3,6 auf 6,5 bis 11,3 Monate (78, 92, 18).

Zwei Therapieschemata werden häufig angewendet: 200 bis 250 mg/m² für 5 Tage alle drei Wochen (78) und 2,0 bis 4,5 mg/kg KG für 10 Tage (139). In sämtlichen Studien korreliert die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs mit verschiedenen Voraussetzungen des Patienten: Er sollte nicht chemotherapeutisch vorbehandelt und weiblich sein sowie Metastasen an Haut, Weichteilen oder Lymphknoten entwickelt haben. Schlechter sprechen Lungenmetastasen an, während sich Gehirn-, Leber- und Knochenmetastasen als sehr resistent erwiesen haben, wobei Einhorn (30) für viszerale Metastasen eine Ansprechquote von 13 % gegenüber nicht viszeralen von

28 % angibt. Ein Autor stellte eine positive Korrelation zwischen dem Therapieerfolg und der Entwicklung einer Leukopenie fest (58).

Die Polychemotherapie des malignen Melanoms unter Einschluß von DTIC erbrachte folgende Ergebnisse: Sämtliche getestete Kombinationen von DTIC und einer zweiten antineoplastischen Droge zeigte keine Verbesserung gegenüber der Monotherapie mit DTIC allein (41, 30, 87). Bei der Anwendung von drei und mehr Chemotherapeutika wurden zum Teil höhere Ansprechraten bis 36 % gefunden (19, 2, 15), ohne daß sich jedoch der palliative Charakter der Behandlung mit kurzen Remissionszeiten um sechs Monate verändert hätte.

DTIC in der adjuvanten, postoperativen Therapie des malignen Melanoms

Während die oben dargelegten theoretischen Überlegungen zur adjuvanten Chemotherapie eine Anhebung der Prozentzahl von 5- und 10-Jahres-Heilungen bei diesem Tumor, der ein biologisch malignes Verhalten durch "schrackenlose lymphogene oder/und hämatogene Metastasenbildung" (6) zeigt, als wahrscheinlich erscheinen ließen, erbrachten die klinischen adjuvanten Studien keine überzeugenden bzw. widersprüchliche Ergebnisse (143, 57, 137, 1). Häufig wird neben der intermittierenden DTIC-Therapie (meist 200 bis 250 mg/m² für fünf Tage alle drei Wochen) bei einer zweiten Patientengruppe eine unspezifische Immuntherapie mit einem BCG-Impfstoff angewandt, während eine dritte Gruppe eine kombinierte Immuno-Chemotherapie erhält. Die BCG-Impfung erfolgt meist mit einem Calmette Guérin-Stamm (138), wobei der Impfstoff im Uhrzeigersinn rotierend wöchentlich bis zu einer 2+ Reaktion an den Oberarmen und Beinen mit einer Heaf Gun appliziert wird, wobei die erste Impfung am 5. Tag des ersten Chemotherapiezyklus verabreicht wird.

Wood (143) fand bei einer zwei Jahre laufenden Studie eine signifikante Überlegenheit der Chemoimmunotherapie gegenüber DTIC oder BCG allein, hinsichtlich der Verminderung von Rückfällen als auch von frühen Todesfällen. Jedoch existiert in dieser Studie keine Vergleichsgruppe mit alleiniger chirurgischer Therapie.

Hill et al. (57) behandelten in einer von 1972 bis 1976 laufenden Studie 174 Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Operation im klinischen Stadium I bis III befanden, mit DTIC in einer Dosierung von 4,5 mg/kg/d mal 10 alle drei Monate für ein Jahr und fanden eine Verlängerung des Intervalls zwischen der Operation und dem Auftreten von Metastasen nur bei den 25 % der Patienten, die eine Thrombozytopenie unter der DTIC-Therapie entwickelt hatten.

Unter Koordination der WHO-International Melanoma Group untersuchten Veronesi et al. (138) insgesamt 761 Patienten mit malignen Melanomen im Stadium II oder Rumpfmelanomen mit Clark-Level 3 bis 5 im Stadium I. Die adjuvante Therapie mit DTIC bzw. BCG bzw. DTIC und BCG begann 10 bis 20 Tage nach der Operation in vierwöchentlichen Intervallen für zwei Jahre. Mit Ausnahme eines Patientenkollektivs, das zum Zeitpunkt der Behandlung mit DTIC und BCG 2 oder 3 LK-Metastasen entwickelt hatte, zeigte keine der verschiedenen Behandlungsgruppen signifikante Verlängerung der Remissionszeiten oder der Gesamt-Überlebenszeiten.

Es wäre jedoch sicher falsch, aus diesen Ergebnissen auf das völlige Versagen des adjuvanten Chemotherapiekonzepts in der Melanombehandlung zu schließen. Zumal die völlige Unberechenbarkeit des Melanom-Verlaufs im Einzelfall bei Therapievergleichen eine statistische Prüfung mit üblichen Verfahren unzureichend macht (68), und die Untersuchung wesentlich größerer Patientenkollektive (nicht wie üblich 100, sondern die 6- bis 8-fache Zahl) erfordert.

Die Wundheilung und ihre Störungen

Der reparative Vorgang der Wundheilung besteht nicht aus einer Abfolge separater Ereignisse, sondern aus teilweise simultan ablaufenden, sich gegenseitig bedingenden Prozessen (52). Diese Einzelkomponenten gehören jedoch gleichzeitig in einen, für alle Säugetierspezies sehr ähnlichen, zeitlichen Zusammenhang, was erstmals Dunphy (25) 1955 zur Postullierung zweier Hauptphasen der Wundheilung, nämlich Substrat und Kollagenphase, veranlaßte. Hegemann (53) ergänzte 1963 eine dritte, die Differenzierungsphase. Diese Einteilung wurde durch neuere histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (24).

1. Entzündungs- oder Substrat-Phase: Es kommt im Anschluß an die Verletzung zur Blutgerinnung und Schorfbildung. Im durch Anfall saurer Metabolite geänderten Milieu kommt es zu Mediatorenfreisetzung aus Mastzellen und Thrombozyten, die ihrerseits zu Permeabilitätserhöhung der Gefäße (Histamin, Kinine) und Leukozytotaxe führt. Nach zwei Stunden beginnt die Autolyse im Wundgebiet durch die in Lysosomen gespeicherten proteolytischen Enzyme. Das geschädigte Gewebe wird abgebaut und gleichzeitig die Bausteine zur Reparation bereitgestellt.
2. Produktionsphase: Nach durchschnittlich zwei Tagen kommt es zur Fibroblastentransformation aus wundständigen Zellen (101). Die Hauptsynthese von Mucopolysacchariden, Elastin und Kollagen dauert etwa 14 Tage lang (62). Gleichzeitig mit der Synthese von Grundsubstanz und Fasern sprossen, ausgehend von den Zellen des Gefäßwandbindegewebes, neue Kapillaren in das Wundgebiet ein (73), bedingt durch den Anoxierez.
3. Die Differenzierungsphase: Nach 12 bis 14 Tagen beginnt die Reifung des Bindegewebes. In dem in der Produktions-

phase bereitgestellten, unreifen Kollagen kommt es zur Ausbildung einer Quartärstruktur und parallel zur Zunahme der Wundreißfestigkeit, die nach zwei Wochen 10 bis 30 % im Vergleich zu unverletzter Haut erreicht (26). Damit parallel beginnt der Abbau von Kapillaren, es kommt zur Schrumpfung des Wundgebietes.

Bei dermalen Wunden erfolgt neben der soeben beschriebenen Granulationsgewebsbildung die Epithellialisierung und die Wundkontraktion: Innerhalb von 12 Stunden nach Wundsetzung kommt es von den Wundrändern her zur Migration basaler und suprabasaler Epithel-Zellen (28), die unterhalb des schtzenden Fibrinschorfes die Wunde langsam von den Seiten her mit einem neuen Epithel berziehen. Im Rahmen der Wundkontraktion entwickeln sich innerhalb des Granulationsgewebes zu Myofibroblasten differenzierende Fibroblasten, deren Myofibrillen-ähnliche kontraktile Elemente im Tiermodell eine tägliche Wundkontraktion um 0,6 bis 0,75 mm bewirken (112, 101).

Testbar in Rudas Modell sind nur die beiden ersten Phasen der Granulationsgewebsbildung. Ohne Relevanz für das Wundmodell bleibt die Reifung und Differenzierung des Kollagens.

Die schwer quantifizierbaren Vorgänge der Epithellialisierung und Wundkontraktion sind durch die Versuchsanordnung verhindert.

Störungen der Wundheilung

Während es bis heute keine Möglichkeit gibt, die Wundheilung zu beschleunigen (73), existiert eine Vielzahl von Faktoren, die zu Wundheilungsstörungen führen können. Dazu gehören Umwelteinflüsse wie Temperatur, Feuchtigkeit, O_2 -Spannung und Wundinfektion ebenso wie individuelle Vor-

aussetzungen des Wundträgers, also Lebensalter oder Erkrankungen, die mit Eiweißmangel oder arterieller Hypoxie einhergehen (24, 102). Daneben beeinflußt eine Vielzahl von Substanzen, darunter auch körpereigene Hormone, den Wundheilungsmechanismus ungünstig, indem sie von der Blutgerinnung bis zur Kollagenpolymerisation einen der vielen Teilschritte der Wundheilung stören (24, 102).

Das von uns untersuchte DTIC, dessen Wirkungsmechanismus nicht vollständig aufgeklärt ist, gehört wahrscheinlich in die Gruppe der Alkylantien, die durch Störung der DNA-Replikation zytotoxisch wirken. Eine Störung der Wundheilung erscheint möglich.

2. VERSUCHSAUFBAU

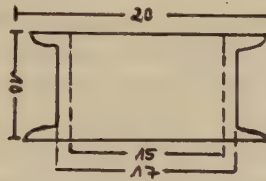
Wundmodell

Grundsätzlich sind bei jeder Wundheilung drei Komponenten beteiligt: die Granulationsgewebsbildung mit Ausreifung von kollagenen Fasern, die Epithelialisierung und die Wundkontraktion.

Da bei unserer Fragestellung die Vaskularisierung und Einheilung eines autologen Spalthauttransplantates für die komplikationslose Wundheilung entscheidend ist, erschienen uns die beiden letztgenannten Teilschritte vernachlässigbar. Wir suchten nach einem Wundmodell, das vorwiegend eine Aussage über die Granulationsgewebsbildung macht und damit auch über die als wichtige reparative Komponente ablaufende Neogenese von Endothellen und Einsprossung von Gefäßen.

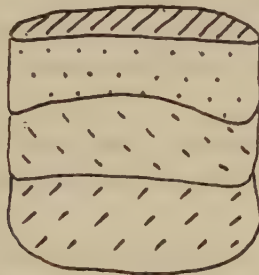
Unter den tierexperimentellen Methoden der quantitativen Granulationsgewebsgewinnung sind besonders zu nennen: Taubenhaus (133), der 1949 mit sterilen Terpentinabszessen arbeitete. Ferner Sejye (115), der durch Einblasen von Luft in die Subcutis und nachfolgendes Einbringen reizender Substanzen wie Terpentin oder Crotonöl einen Granulombeutel erzeugte. Dunphy und Edwards (29) implantierten 1957 subcutan poröse Polyvinylschwämme und maßen das eingewachsene Granulationsgewebe. Nachteile aller dieser Methoden sind, daß die Menge an gebildetem Granulationsgewebe indirekt durch Gewichtszunahme subcutan implantierter Fremdkörper, die durch- oder umwachsen werden, gemessen wird bzw. daß durch chemische Agentien (wie Terpentinöl) ein Reizzustand erzeugt wird, der mit einem reinen Verletzungsreiz nicht gleichzusetzen ist.

Deshalb entschieden wir uns für die von Rudas 1960 (110) entwickelte Methode, rein reparatives Granulationsgewebe quantitativ zu gewinnen. In die Wunden wurden dabei Kunststoffringe eingesetzt, die eine Epithelialisierung und Kontraktion verhinderten und ein gleichmäßiges Granulationsgewebswachstum vom Wundgrund her ermöglichten.



Maßstab 2:1

Abb. 4: Maße des verwendeten Polyvinylzylinders



Schorf

Zone starker Entzündung

Proliferation von BG-Zellen

Basalzone: Rückgang zellulärer Elemente - Zunahme faseriger Elemente

Abb. 5: Schematischer Aufbau des Granulationsgewebspropfes nach Kovac und Rudas (71)

Methodik

Versuchstiere waren männliche Albinoratten, Stamm SD, zwischen 200 und 300 g schwer, die während der Versuchsdauer in Einzelkäfigen gehalten wurden.

Bei Versuchsbeginn wurde den mit Äther narkotisierten Tieren die Rückenhaut über der Lendenwirbelsäule rasiert und mit Jod desinfiziert. Nach Aufheben der Haut genau median über den Processus spinales wurde ein kreisförmiges Stück Haut von ungefähr 10 mm Durchmesser bis auf die Fascie herausgeschnitten. Mit Hilfe von Klemmen und Pinzetten wurde nun unter die Ränder des runden Wundbereichs ein Polyvinylring eingebracht, dessen Ränder um 2,5 mm ausgebogen sind. Die Außenabmessung beträgt 22 mm, die lichte Weite 15 mm. Fixiert wurde der Kunststoffzylinder durch die Kontraktion der Wundränder. Den dorsalen Abschluß der Kammern bildete ein feinmaschiges Drahtnetz, um Verunreinigung zu vermeiden und gleichzeitig die Zufuhr von Sauerstoff zu sichern. Nach Einsetzen des Ringes wurde eine 0,1 %ige Gentamycin-salbe in den Zylinder eingebracht.

Die Tiere wurden nach einer Zufallsverteilung einer der drei Versuchsgruppen zugeteilt und erhielten während der neuntägigen Versuchsdauer täglich vom 1. bis 5. Tag nach Wundsetzung eine intraperitoneale Injektion von DTIC oder - in der Kontrollgruppe - von physiologischer Kochsalzlösung.

Die Ratten wurden zu Versuchsbeginn, nach vier und nach neun Tagen gewogen, um einen Parameter für den Allgemeinzustand zu erhalten.

Nach neun Tagen wurden die Tiere durch Entbluten getötet und nach Entfernung des meist gelockerten Kunststoffrings die Präparation des Granulationsgewebespropfes vorgenommen. Dieser ließ sich stets leicht von der Fascie abgrenzen. Gleichzeitig erfolgte ein bakteriologischer und ein mykologischer Abstrich. Zum qualitativen Nachweis einer bakteriologischen Wundkontamination erfolgte bei 37 °C die 24-stündige Bebrütung eines Blutagar-Ausstriches und zusätzlich eines Endo-Agars zum Nachweis pathogener gramnegativer Darmkeime. Die mykologischen Abstriche wurden auf einen Sabouraud-Dextrose-Agar aufgebracht und sieben Tage bei Raumtem-

peratur bebrütet. Das gewonnene Material wurde in Petrischalen bis zur Wägung, die stets am Entnahmetag erfolgte, aufbewahrt.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Versuchsanordnung

1. Es wurden drei Versuchsanordnungen gewählt. Bei der ersten Gruppe (A) wurde den Versuchstieren über fünf Tage täglich 1 ml 0,9 % NaCl intraperitoneal verabreicht.

Den Tieren der zweiten Gruppe (B) wurde täglich für fünf Tage eine bestimmte DTIC-Dosis intraperitoneal injiziert, die der menschlichen Dosis von 250 mg/m²/die entspricht.

In der Gruppe C wurde den Tieren die 3-fach höhere Dosis gegeben, entsprechend 750 mg/m²/die.

2. Die Versuche wurden mit je ca. 25 Tieren unternommen. Nach einer Zufallszahlenreihe wurden die Ratten den Gruppen A/B/C zugeteilt. Drei Wiederholungen (1), (2), (3) der gesamten geschilderten Anordnung wurden durchgeführt, bei einer vierten Versuchsreihe wurden weitere elf Tiere verwendet und diese zufällig den Dosierungen A und C zugeordnet, ohne die Variante B zu testen.

DTIC-Dosierung

Die Berechnung der applizierten DTIC-Menge ergab sich aus den Arbeiten von Freireich (38) und Goldsmith (44). In beiden Arbeiten wird der Versuch unternommen, aus den Toxizitätsdaten bei Tierversuchen eine Voraussage zu machen über beim Menschen risikolos applizierbare Zytostatikadosierungen. Wir benutzten die Arbeiten zum Umkehrschluß von einem fest etablierten Therapieschema beim Menschen auf die entsprechende Dosis bei der Ratte.

Freireich kam zu dem Schluß, daß die toxischen Parameter

von Zytostatika unter verschiedenen Säugetierspezies ähnlich sind, wenn sie auf die Körperoberfläche bezogen werden. Wir konnten also davon ausgehen, daß die menschliche Dosis von 250 mg/m²/die auch für die Ratte gelte. Jedoch wollten wir die zu applizierende DTIC-Dosis über das Körpergewicht der Tiere bestimmen und verwendeten den von Freireich angegebenen Konversionsfaktor zu folgender Umrechnung:

G = Gewicht Ratte

F = Oberfläche Ratte

D = Dosis/kg

d = Dosis/m²

(km) = Konversionsfaktor = $\frac{G}{F}$

1. mg/m²-Basis → MTD aller Spezies gleich

2. mg/kg-Basis → MTD Mensch = 1/7 LD₁₀ Ratte

MTD = Mittlere Therapeutische Dosis

LD₁₀ = Dosis, die eine 10 %ige Letalität bedingt

nach 1.

Mensch: d Mensch = 250 mg/m² = d Ratte = 250 mg/m²

Angabe der Konversionsfaktoren von Freireich

d = (km) · x (D)

(km) := Konversionsfaktor, der dem Standard-Zusammenhang der entsprechenden Spezies zwischen Gewicht und Oberfläche entspricht.

Tabelle 3: Standardzusammenhang zwischen Körpergewicht und Oberfläche bei der Ratte

	Körpergewicht in kg	Oberfläche	km
Ratte	0,100 kg	0,0194	5,2
	0,150 kg	0,0254	5,9
	0,200 kg	0,308	6,5
	0,250 kg	0,0357	7,0

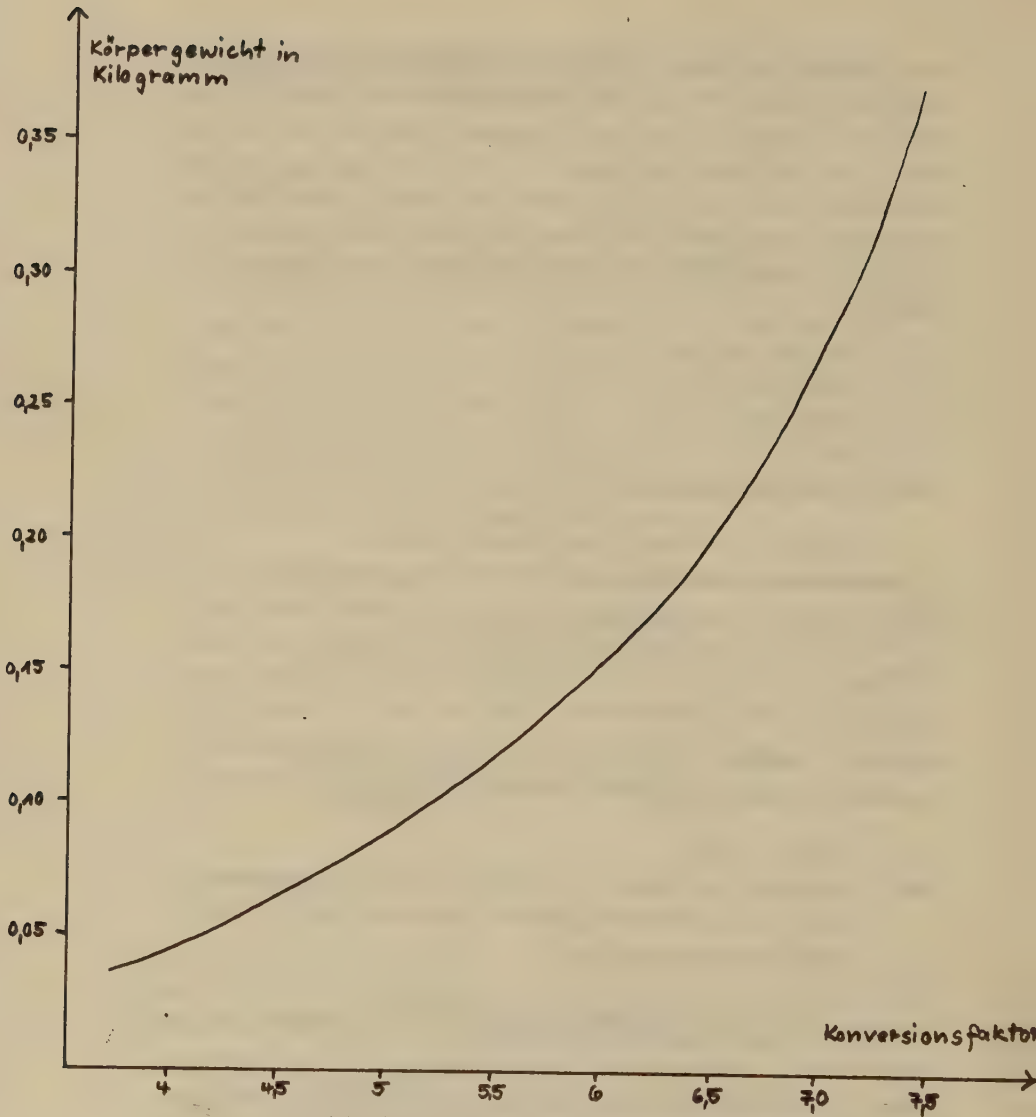


Abb. 6 : Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Oberfläche und Körpergewicht bei der Ratte

Daraus ergab sich z.B. für eine Ratte von 200 g KG:

$$D_{\text{Ratte}} = d_{\text{Ratte}} : C = \frac{250 \text{ mg/m}^2}{6,5 \text{ kgxm}^2} = 38 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

Diese Tagesdosis wurde täglich für fünf Tage verabreicht, beginnend am Tag der Wundsetzung.

3. Die jeweils gemessene Variable war die entstandene Menge G an Granulationsgewebe in der Wundkammer. Die Variable ist normalverteilt und so konnten die Unterschiede der Mittelwerte von G in den Versuchsgruppen A, B, C und E, F, G untereinander mit Hilfe des T-Tests für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft werden (136, 10). Der T-Test kann angewendet werden, wenn

- es sich um zwei Reihen von Meßdaten an verschiedenen Objekten handelt,
- die Meßdaten in etwa normalverteilt sind und
- die Varianzen in den einzelnen Gruppen von Meßdaten etwa gleich sind.

Man prüft dabei, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Testreihen besteht. Dazu wird der T-Test ermittelt (Abbildung 7) und mit dem Tabellenwert der t-Verteilung (Studentverteilung) verglichen. Eine Signifikanz der Werte besteht dann, wenn der aus den Daten berechnete t-Wert größer als der aus der Tabelle ermittelte ist. Die Werte werden für ein Signifikanzniveau von 1 % und 5 % angegeben, üblicherweise wird ein Niveau von 1 % gefordert.

Rechenschritte:

- 1) Summe der Einzelwerte in g des Granulationsgewebes $\sum x$
- 2) Mittelwert $\frac{\sum x}{n} = \bar{x}$
- 3) $(\sum x)^2$
- 4) $\sum x^2$ Summe der quadrierten Einzelwerte
- 5) $\frac{(\sum x)^2}{n}$
- 6) $n =$ Fallzahl
- 7) SAQ (Summe der Abweichungsquadrate) $= \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$
- 8) Varianz $= s^2 = \frac{SAQ}{n-1}$
- 9) $F\text{-Wert} = s_1^2 / s_2^2$
- 10) $\bar{d} = \text{Mittelwert}_1 - \text{Mittelwert}_2 = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$
- 11) Summe des Stichprobenumfanges $n_1 + n_2$
- 12) $n_1 \cdot n_2$
- 13) $\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}$
- 14) $SAQ_{\text{ges}} = SAQ_1 + SAQ_2$
- 15) $\frac{SAQ_{\text{ges}}}{n_1 + n_2 - 2}$
- 16) Freiheitsgrade $n_1 + n_2 - 2$
- 17) $\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \cdot \frac{SAQ_{\text{ges}}}{n_1 + n_2 - 2}$
- 18) $\sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \cdot \frac{SAQ_{\text{ges}}}{n_1 + n_2 - 2}}$
- 19) T-Wert:
$$\frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \cdot \frac{SAQ_{\text{ges}}}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

Abb. 7: T-Test für unverbundene Stichproben

Die in den Versuchen (1) bis (4) erhaltenen Ergebnisse wurden unter einem der Behandlungsmodi A, B und C jeweils zusammengefaßt. Die Gruppen A und C sowie A und C wurden verglichen und auf signifikante Differenzen geprüft.

Um den Einfluß der bakteriellen bzw. mykotischen Kontamination bzw. Besiedlung der Wundkammern auf die erhaltene Menge von Granulationsgewebe auszuwerten, wurden die Meßwerte der Versuche (1) bis (4) entsprechenden Kontaminationsgruppen zugeordnet. Da keine pathogenen Pilze nachgewiesen wurden, ergaben sich drei Gruppen:

E = Hautkeime,

D = gramnegative Keime und

F = steril.

Es wurde nach einer Signifikanz der Änderung der Mittelwerte des Gewichts der jeweiligen Granulationsgewebe ebenfalls mittels des t-Tests gefahndet.

Ergebnisse

In jeder der vier Versuchsreihen fielen einige Tiere vor Versuchsende aus folgenden Gründen aus: Häufigste Ursache war eine frühzeitige Lockerung des Plastikringes, was eine Beurteilung der Granulationsgewebsbildung unmöglich machte. Zwei Tiere erlitten während der intraperitonealen Injektion offensichtlich eine Ruptur der Bauchaorta. Dieses und wohl auch das bei wenigen Tieren an unterschiedlichen Tagen aufgetretene Nasenbluten während der Injektion führten wir auf die zum Teil heftigen Befreiungsversuche der Ratten während der Injektionen zurück.

Zwei Tiere verstarben aus unbekannter Ursache während der ersten Versuchstage. Alle übrigen machten trotz der eingesetzten Plastikzylinder und der täglichen Injektion einen lebhaften Eindruck. Keines der zur Auswertung gekommenen

Tiere nahm während der Versuchsdauer an Gewicht ab. Makroskopisch war bei keinem der präparierten Granulationsgewebszylinder eine Wundinfektion zu erkennen. Die teilweise außerhalb der Ringe entstandenen Verdickungen des Subkutangewebes erwiesen sich stets als Granulationsgewebe, dessen Bildung eventuell durch den Reiz des ja anfangs auf der Wirbelsäule noch beweglichen Ringes angeregt wurde. Dieses zusätzliche Gewebe wurde nicht ausgewertet.

Meßergebnisse

Wägegewichte:

Gruppe A (0,9 %ige NaCl-Lösung i.p. vom 1. bis 5. Tag nach Wundsetzung)

310	370
600	580
470	480
370	640
400	630
250	560
280	510
330	340
560	740
860	650
650	640

Fallzahl	$n = 22$
Summe der Einzelwerte	$\sum x_A = 11216$
Mittelwert	$\bar{x}_A = 509$
Summe der Abweichungsquadrate	$\sum (x_A - \bar{x}_A)^2 = 438404$
Standardabweichung des Stichprobenmittels	$s_{x_A} = 31$

Wägegewichte:

Gruppe B (klinische DTIC-Dosis vom 1. bis 5. Tag nach Wundsetzung)

680	630
420	430
300	570
500	630
530	640
390	700
570	340
240	500
560	640
400	980
780	840
360	560
300	870
	840

Fallzahl

$$n_B = 27$$

Summe der Einzelwerte

$$x_B = 15204$$

Mittelwert

$$\bar{x}_B = 563$$

Summe der Abweichungsquadrate

$$SAQ_{\text{gesamt}_B} = 619665$$

Standardabweichung des Stichprobenmittels

$$s_{x_B} = 29$$

Wägegewichte:

Gruppe c (3-fache klinische Dosis vom 1. bis 5. Tag nach Wundsetzung)

140	790
280	840
350	440
440	160
450	870
230	430
380	500
410	700
440	340
670	770
760	710
360	610
520	650
550	540

Fallzahl

$$n_C = 28$$

Summe der Einzelwerte

$$x_C = 14427$$

Mittelwert

$$\bar{x}_C = 515$$

Summe der Abweichungsquadrate

$$SAQ_{\text{gesamt}_C} = 640847$$

Standardabweichung des Stich-
probenmittels

$$S_{x_C} = 28$$

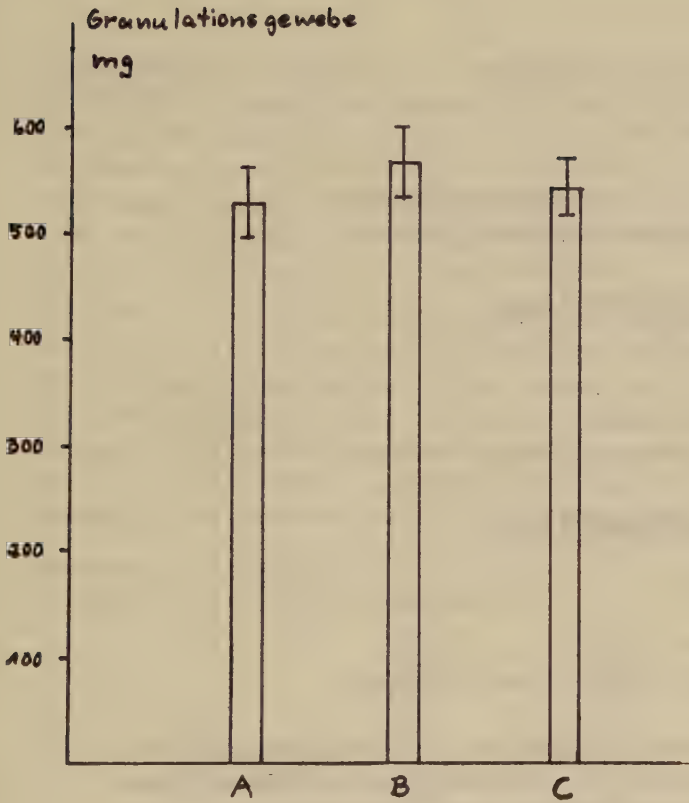


Abb. 8: Graphische Darstellung der Wägegewichte der Gruppen A, B und C

($\bar{x}$ und S_x)

A: Kontrollserie

B: DTIC, klinische Dosis

C: DTIC, 3-fache klinische Dosis

Vergleich der Gruppen A und B

Freiheitsgrade: 47

$t = 1,256$

5 % Niveau: $t = 2,012$ (Studentverteilung)

=> keine Signifikanz auf dem 5 %-Niveau

Vergleich der Gruppen A und C

Freiheitsgrade: 48

$+ = 0,3$

5 %-Niveau: $t = 2,009$

=> keine Signifikanz auf dem 5 %-Niveau

Vergleich der Gruppen B und C

Freiheitsgrade: 53

$t = 1,2$

5 %-Niveau: $t = 2,006$

=> keine Signifikanz auf dem 5 %-Niveau

Der statistische Vergleich der drei Behandlungsgruppen A, B und C hinsichtlich der gebildeten Granulationsgewebsmenge ergibt keine Signifikanz auf dem 5 %-Niveau.

DTIC, in klinischen Dosen bzw. in dreifach höherer Dosis vom 1. bis zum 5. Tag nach Wundsetzung Ratten intraperitoneal verabreicht, beeinträchtigt die frühen Phasen der Granulationsgewebsbildung nicht.

Auswertung der bakteriellen Besiedlung

Um auszuschließen, daß die kulturell qualitativ nachgewiesene bakterielle Kontamination der Wundheilungskammern einen Einfluß auf die Granulationsgewebsbildung hatte, bildeten wir drei Gruppen: D, E und F. D bedeutet Besiedlung

mit gramnegativen Keimen, E mit Hautkeimen und bei F wurde kein Bakterienwachstum nachgewiesen. Lag eine Mischbesiedlung vor, ordneten wir die Versuchstiere bei Nachweis von gramnegativen Keimen, d.h. bei Anzüchtung meist von *Pseudomonas aeruginosa* auf dem Selektivmedium, der Gruppe D zu. Die auf dem Endo-Agar wachsenden *Pyocyaneus*-Keime waren als violette Kolonien zu identifizieren.

Diese Einteilung scheint uns vertretbar, da Tenorio (134) und Raju (104) in ihren Untersuchungen über den Einfluß bakterieller Keimbesiedlung auf die Wundheilung bis zu einer Inokulationsdosis von 10^8 Keimen pro ml keine Wundheilungsstörungen fanden, mit Ausnahme der *Pseudomonas*-infizierten Inzisionswunden, die eine überschließende lokale Entzündung und Verminderung der Wundreißfestigkeit zeigten.

Wägegewichte Gruppe D:

gramnegative Besiedlung (*Pseudomonas*)

310	450	640
600	230	630
370	380	780
400	560	570
250	700	430
420	500	630
300	410	440
500	440	870
390	520	430
570	650	500
240	370	700
560	580	610
440	480	540

Fallzahl

$$n_D = 39$$

Summe der Einzelwerte

$$x_C = 19400$$

Mittelwert

$$\bar{x}_D = 497$$

Summe der Abweichungsquadrate

$$SAG_{\text{gesamt}_D} = 806791$$

Standardabweichung des Stichprobenmittels

$$s_{x_D} = 23$$

Wägegewichte Gruppe E:

Besiedlung mit Hautkeimen (Streptokokken, Staph. aureus, Staph. Albus)

470	360
680	340
530	510
140	740
330	650
840	640
840	770
760	710
790	650
340	

Fallzahl

$$n_E = 19$$

Summe der Einzelwerte

$$x_E = 11090$$

Mittelwert

$$\bar{x}_E = 583$$

Summe der Abweichungs-
quadrate

$$SAG_{gesamt_E} = 753571$$

Standardabweichung des
Stichprobenmittels

$$S_x = 47$$

Wägegewichte der Gruppe E:

Sterile Wunden

280	360
350	550
280	940
860	400
640	630
980	160
560	560
870	340
670	

Fallzahl	$n_F = 19$
Summe der Einzelergebnisse	$x_F = 10371$
Mittelwert	$\bar{x}_F = 544$
Summe der Abweichungsquadrate	$SAG_{F \text{ gesamt}} = 1175544$
Standardabweichung des Stichprobenmittels	$S_{\bar{x}_F} = 59$

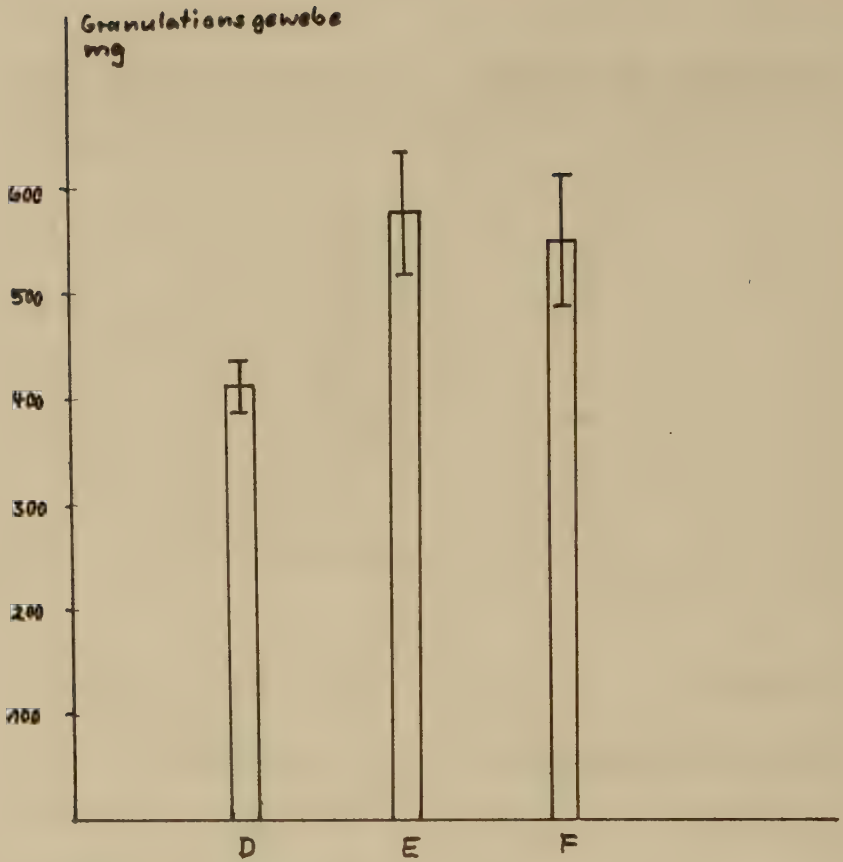


Abb. 9: Graphische Darstellung der Wägegewichte der Gruppen D, E, F

($\bar{x}$ und $S_{\bar{x}}$)

D: gramnegative Keime

E: Hautkeime

F: sterile Wunden

Vergleich der Gruppen D und E

Freiheitsgrade: 56

$t = 1,9$

5 %-Niveau: $t = 2,003$ (Studentverteilung)

=> keine Signifikanz auf dem 5 %-Niveau

Vergleich der Gruppen D und F

Freiheitsgrade: 56

$t = 0,61$

5 %-Niveau: $t = 2,003$ (Studentverteilung)

=> keine Signifikanz auf dem 5 %-Niveau

Vergleich der Gruppen E und F

Freiheitsgrade: 36

$t = 0,52$

5 %-Niveau: $t = 2,032$ (Studentverteilung)

=> keine Signifikanz auf dem 5 %-Niveau.

Der statistische Vergleich der Granulationsgewebismenge in Abhängigkeit von der Keimbesiedlung zeigt, daß diese keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis hatte.

4. DISKUSSION

=====

Ziel unserer Untersuchungen war es festzustellen, ob durch Intraperitoneale Applikation von DTIC die Wundheilung bei Ratten beeinflußt wird.

Diese Frage erscheint insbesondere hinsichtlich einer immer aggressiveren Malignomtherapie interessant, die den Primärtumor oder auch Metastasen chirurgisch angeht und gleichzeitig durch adjuvante Chemotherapie Mikrometastasen und abgeschwemmte Tumorzellen zu vernichten sucht. Die Theorie der adjuvanten Chemotherapie läßt eine möglichst frühzeitige, perioperative Anwendung der Zytostatika als erfolgversprechendsten Versuch erscheinen, bei bestimmten Tumoren die Überlebenszeiten zu verbessern. Jedoch stellt sich die Frage, ob die antiproliferativen Chemotherapeutika einen Einfluß auf die Wundheilung haben, sowohl direkt auf den reparativen Vorgang als auch indirekt über systemische Effekte wie Gewichtsabnahme oder Knochenmarksdepression (121, 13) usw.

Wundmodell

Um den Einfluß von DTIC auf die Granulationsgewebsbildung bei Ratten quantitativ erfassen zu können, wählten wir das von Rudas (110) entwickelte Modell einer modifizierten offenen-granulierenden Wunde. Bei den Versuchstieren wurden Polyvinylzylinder zur Verhinderung von Wundkontraktion und Epithelialisierung eingesetzt und ein reines Granulationsgewebe als Parameter dermalen Wundheilung gewonnen.

Bei der Fragestellung, ob bestimmte Zytostatika die Wundheilung im Tiermodell beeinflussen, gingen die meisten Autoren vom Effekt auf primärheilende, nahtadaptierte Inzi-

sionswunden aus (121). Daraus erklärt sich, daß als Parameter der Wundheilung meist die Reißfestigkeit von Haut-, Laparatomie- oder Darmwunden herangezogen wurde.

Da wir bei der Fragestellung, ob DTIC in klinischen Dosen die Wundheilung störe, vom Problem der Melanombehandlung ausgingen, erschien uns ein Wundmodell, das vor allem die Synthese und Reifung von Kollagen als Zunahme der "Reißfestigkeit" mißt, wenig geeignet. Bei der Operation von malignen Melanomen entstehen durch dreidimensional 3-5 cm in Gesunden durchgeführte Exzision so große Wundflächen, daß diese selten durch eine Naht zu schließen und damit einer primären Heilung zuzuführen sind. Meist macht die Größe des Defektes ein autologes Spalthauttransplantat erforderlich.

Für das Einheilen eines Spalthauttransplantates ist entscheidend eine ungestörte Vaskularisierung vom Wundgrund her. Da die Endothelproliferation und Neubildung von Gefäßen (neben der Bindegewebszellproliferation) entscheidend für die Menge an Granulationsgewebsbildung ist, erschien uns das Rudas-Modell geeignet.

Rudas selbst untersuchte mit der von ihm entwickelten Methode den Einfluß von Hydrocortison auf die Sekundärheilung und erzielte mit oraler Gabe von 15 mg/kg Cortisol eine Reduktion des Granulationsgewebes um die Hälfte (110).

Der Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung wurde von Hoppe (59) mit dem Rudas-Modell getestet. In dieser Studie werden jedoch nicht klinische, sondern toxische Dosen getestet, die teilweise der LD_{50} (Letale Dosis für 50 % der Versuchstiere) der Ratten entsprachen, so daß ein Rückschluß auf die Störung der Wundheilung durch perioperative Gabe der untersuchten Zytostatika nur bedingt möglich ist.

Dosisabhängigkeit und Applikationsform

Wie bei jeder tierexperimentellen Studie erscheint die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse über den Einfluß von DTIC auf die Wundheilung bei der Ratte auf die Vorgänge beim Menschen problematisch. Dabei stellt weniger die Wundheilung als ein bei Mensch und Tier sehr ähnlich ablaufender Vorgang eine Schwierigkeit dar, sondern vor allem die Vergleichbarkeit der verabreichten Dosis im Tierversuch und bei der menschlichen Tumorthherapie.

Ausgehend von der klinischen Dosis von $250 \text{ mg/m}^2/\text{die}$ berechneten wir die entsprechende bei den Versuchstieren anzuwendende Dosis mit Rückgriff auf Freireichs Arbeit über toxikologische Daten bei Mensch und Tier (38). Während sich die Dosen, bezogen auf die Körperoberfläche, bei allen Spezies entsprechen, muß bei der Berechnung einer Körpergewicht-bezogenen Dosis ein Konversionsfaktor benutzt werden, der Spezies- und Körpergewichts-abhängig ist.

Um auszuschließen, daß eine geringe Erhöhung über die der klinisch-menschlichen Zytostatikaapplikation entsprechende Dosis einen quantitativ oder qualitativ anderen Effekt zeigt als die 250 mg/m^2 -Äquivalenzdosis, führten wir neben einer Kontrollgruppe auch einen Behandlungsarm mit der 3-fachen klinischen Dosis, entsprechend 750 mg/m^2 . Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen, die zeigen, daß DTIC bis zu einer Äquivalenz-Dosis von 750 mg/m^2 keinen Einfluß auf die Wundheilung bei Ratten hat, kann nicht selbstverständlich auf höhere Dosen geschlossen werden. Das wird nahegelegt durch die deutlich dosisabhängige Wirkung anderer Zytostatika wie Cyclophosphamid (14), Methotrexat (9) und Adriamycin (22) auf die Wundheilung in tierexperimentellen Studien, wobei die Versuchsdosen die klinischen Äquivalenzdosen meist weit überschreiten.

Die Intraperitoneale Verabreichung von DTIC erschien uns gegenüber der technisch schwierigen Katheterisierung der Schwanzvene der Ratten von Vorteil, zumal die Intraperitoneale und intravenöse Applikation zu vergleichbaren Serumspiegeln führen (135).

Applikationsschema

Da in den chirurgisch-adjuvanten DTIC-Protokollen meist 250 mg/m^2 für fünf Tage verabreicht werden, applizierten wir den Versuchstieren ebenfalls vom Tag 1 des Einsetzens des Plastikringes bis zum Tag 5 die 250 mg/m^2 Äquivalenzdosis bzw. in Versuchsarm C die dreifache Dosis.

Folgende Überlegung war dafür ausschlaggebend: In vielen Studien über den Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung erweist sich nicht nur eine deutliche Dosisabhängigkeit, sondern auch der Zeitpunkt der Applikation des Chemotherapeutikums bezogen auf die Wundsetzung scheint von großer Wichtigkeit für das Ausmaß der Wundheilungsstörung. So hat Adriamycin den größten Effekt vom Tag -7 bis +3, bezogen auf den Tag der Wundsetzung (22), während z.B. Nitrogen-Mustard als Einmaldosis nur am dritten postoperativen Tag den reparativen Vorgang störte (93). Allgemein nimmt das Ausmaß der Wundheilungsstörung mit Zunahme des Intervalls zwischen Wundsetzung und Zytostatikaapplikation ab (121).

Da die spezielle Fragestellung der perioperativen adjuvanten Melanomtherapie uns eine Tagesdosis und ein Dosierungsschema von 250 mg/m^2 für fünf Tage vorgab, verabreichten wir den Versuchstieren, beginnend am Tag der Wundsetzung, DTIC nach demselben Schema. Eine einmalige Applikation der Kumulativdosis schien uns wegen der kurzen Halbwertszeit des DTIC (35 min beim Menschen (47)) unbrauchbar, da eine

möglichst lange Phase der Wundheilung unter dem Einfluß des Zytostatikums ablaufen sollte.

Gesunde Ratten als Versuchstiere - Übertragbarkeit der Ergebnisse auf tumorkranke Menschen

Neben der Vergleichbarkeit der täglich applizierten Dosis bei Mensch und Tier erschien auch problematisch die Übertragbarkeit einer Studie bei gesunden Tieren auf Verhältnisse beim tumorkranken Menschen. Cohen (14) untersuchte 1975, welchen Einfluß die Anwesenheit einer großen B16-Melanom-Tumormasse bei Mäusen auf die Beeinträchtigung der Wundheilung durch Cyclophosphamid hatte. Obwohl die Kontrolltiere ohne Chemotherapie große Tumoren und Tumor-Kachexie entwickelten, hatte dies keinen Einfluß auf die Wundheilung. Umgekehrt zeigten die mit 200 mg/kg i.p. behandelten B16-Melanom-Mäuse keine andere Reaktion auf Cyclophosphamid als tumorlose, ebenfalls zytostatisch behandelte Mäuse: Die Beeinträchtigung der Reißfestigkeit zeigte keinen Unterschied. Wir schließen uns daher der Meinung von Cohen an, daß "das Studium der Effekte von Drogen auf die Wundheilung normaler Tiere als ein relevantes Modell erscheint für eine chirurgisch-adjuvante Therapie bei Krebspatienten."

Tierexperimentelle Studien über den Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung

So selbstverständlich eine negative Beeinflussung der Wundheilung durch Zytostatika erscheint, wenn man deren Wirkungsmechanismen betrachtet, so widersprüchlich sind die Ergebnisse tierexperimenteller Studien zu diesem Problem.

Zur Klärung des Einflusses von Zytostatika auf die Wundheilung wird seit 1957/58 (17, 32) am häufigsten der Parameter "Reißfestigkeit" herangezogen. Schon Howes (61) stellte 1929 eine gute Korrelation zwischen den histologischen Stadien der Wundheilung und der Zunahme der Reißfestigkeit fest. Nach Durchtrennung und primärer Adaptation wird die Reißfestigkeit von Laparatomie oder von dermalen Wunden getestet, indem Streifen bestimmter Abmessungen, die die Inzision einschließen, einem standardisierten Zug ausgesetzt werden. Dieselbe Methode, übertragen auf Magen- und Darmnähte, hat sich als sehr ungenau erwiesen, da nach dem Laplace-Gesetz ($T = P \times R$) der Rupturdruck (T) von Hohlkörpern nicht nur vom Druck (P), sondern auch vom Radius (R) abhängt (72).

Ein weiteres Wundheilungsmodell stellt die von Devereux (22) 1980 benutzte, von Madden und Peacock (81) 1967 entwickelte Methode dar, durch Injektion von H^3 -markiertem Prolin und folgender Messung von H^3 -Hydroxyprolin die Kollagenproduktion in dermalen Wunden unter Adriamycin zu messen.

Das von Rudas entwickelte Wundheilungsmodell, welches die Modifikation einer offen granulierenden Wunde darstellt, wurde nur einmal zur Testung des Einflusses verschiedener Zytostatika auf die Wundheilung herangezogen (59). Zu erwähnen sind ferner eine Untersuchung von Desprez (21), der den Einfluß von Cyclophosphamid auf die Vaskularisation und damit das Überleben autologer Hauttransplantate bei der Maus testet.

Ergebnisse

Um die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse herauszustellen, geben wir eine Übersicht der tierexperimentellen Studien über den Einfluß der meistuntersuchten Zytostatika auf die Wundheilung.

Tabelle 4: Zusammenfassung früherer Studien über den Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung im Tiermodell

Zytostatikum	Wundort	Einfluß auf Wundheilung	Autoren
Thio-Tepa	Laparatomie	Ø	17,33,50,105
Thio-Tepa	Laparatomie	beeinträchtigt	100
Nitrogenmustard	Laparatomie Darm, Haut	Ø	17,45,51
Nitrogenmustard	Laparatomie Darm	beeinträchtigt	32,50,93
Cyclophosphamid	Haut	Ø	9,82
Cyclophosphamid	Haut, Laparatomie	beeinträchtigt	14,21,66,91
5-Fluorouracil	Haut	Ø	9,13
5-Fluorouracil	Darm, Laparatomie	beeinträchtigt	43,131,88,96
Methotrexat	Haut	beeinträchtigt	9
Methotrexat	Haut	Ø	13
Adriamycin	Haut	Ø	14
Adriamycin	Haut	beeinträchtigt	22
Bleomycin	Haut	beeinträchtigt	13

modifiziert nach Cohen et al. (13)

Diese widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich Dosis, Applikationsmodus und Zeitpunkt der Zytostatikagabe interpretierend ergibt sich folgendes:

Thio-Tepa:

Es handelt sich um eine relativ inaktive Substanz bei topischer Anwendung. Nur ein Autor (100) beschreibt die Minde-

rung der Wundreißfestigkeit von Laparatomie-Wunden bei Ratten nach Gabe von 4 bis 8 mg/kg i.p. am Tag der Wundsetzung. Klinische Vergleichsdosis: 0,07 bis 0,15 mg/kg/die (67).

Nitrogen-Mustard:

Während von mehreren Autoren (32, 50, 93) die Minderung der Reißfestigkeit (RFK) von Laparatomie-Wunden bei Ratten nach mindestens 0,3 mg/kg i.v. am Tag der Wundsetzung angegeben wird, fand Harris (51) bei dermalen Wunden keinen negativen Einfluß weit größerer Nitrogen-Mustard-Dosen, nämlich 2,5 mg/kg. Newcombe (93) applizierte 0,5 mg/kg in unterschiedlichem Abstand von der Wundsetzung, wobei nur die am 3. Tag behandelten Versuchstiere eine Verminderung der Kollagenbildung zeigten. Klinische Vergleichsdosen: 0,4 mg/kg KG/die (67).

Cyclophosphamid:

Ab einer Gesamtmenge von 165 mg/kg oder mehr, i.p. oder i.m. verabreicht, zeigt diese Droge übereinstimmend eine Minderung der RFK von Haut- und Laparatomie-Wunden (21). Bei niedrigerer Dosierung finden sich keine konsistenten Ergebnisse. Cohen (14) arbeitete mit einer der LD_{10} entsprechenden Dosis von 300 mg/kg i.p. bei Mäusen und fand eine Beeinträchtigung der späteren Wundheilungsphasen vom 7. Tag an. Mann (82) untersuchte den Einfluß des Alters auf die Wundheilung bei Ratten. Während 19 bis 21 Monate alte Tiere im Vergleich zu jungen (5 bis 6 Monate) eine signifikant geringere Zunahme der Reißfestigkeit und eine verminderte Fibroblastenaktivität zeigten, hatte die Applikation des Zytostatikums in einer Dosierung von 20 mg/kg KG/die keinen Einfluß bei jungen Tieren bzw. keinen additiven Effekt bei alten Tieren. Desprez (21) arbeitete 1960 mit homologen Hauttransplantaten und fand unter 22 bis 250 mg/kg Gesamtdosis eine zunehmende Verzögerung der Transplantatvaskularisation vom 2. auf den 3. oder 4. Tag, jedoch

keine histologischen Veränderungen oder Transplantatnekrosen. Klinische Vergleichsdosis: 1,5 bis 3 mg/kg/die oder Stoßtherapie 1 mal 7 bis 25 mg/kg (67).

5-Fluorouracil:

Das bei diesem Zytostatikum häufig gewählte intestinale Wundheilungsmodell ist aus methodischen Gründen (Bedeutung des Laplace-Gesetzes für den "Bursting Pressure" von Hohlkörpern) unzuverlässig. Laparatomie-Wunden bei Ratten, die mit 75 mg/kg i.m. während der zwei ersten Tage nach Wundsetzung bzw. 20 mg/kg i.p. als Einmaldosis behandelt wurden, zeigten eine Verminderung der Wundreißfestigkeit (131, 96), während dermale Wunden bei Mäusen bei weit höherer Dosis von 180 mg/kg i.p. (13) unbeeinträchtigt heilten. Klinische Vergleichsdosen: 5 bis 15 mg/kg/die (67).

Methotrexat:

Dieser Antimetabolit zeigt eine deutlich dosisabhängige, von 0,125 bis 10 mg/kg/die verabreichter Dosis zunehmende Beeinträchtigung der Heilung dermalen Wunden bei Ratten (9). Es scheint eine Abhängigkeit zwischen dem Zeitpunkt der Applikation und dem erzielten Effekt zu bestehen, wobei eine Verabreichung nach der Wundsetzung wirksamer ist. Cohen (13) fand nur am dritten Tag, jedoch nicht mehr am 7. und 21. einen negativen Einfluß auf die Heilung dermalen Wunden bei Ratten bei einer Dosis von 80 mg/kg, einmalig am Tag der Wundsetzung. Klinische Vergleichsdosen: 0,05 bis 0,15 mg/kg/die in Abständen.

Adriamycin:

Gemessen an der RFK zeigen Ratten, die mit 5 mg/kg (LD_{10-20}) unmittelbar postoperativ behandelt werden, eine starke Beeinträchtigung der Wundheilung (22). Klinische Vergleichsdosis: 0,5 mg/kg/die, drei Tage lang.

Bleomycin:

Bei Dosen von 30 mg/kg i.p. am Tag der Wundsetzung werden bei Mäusen die frühen Phasen der Wundheilung vom 3. bis 7. Tag beeinträchtigt (13), gemessen am Parameter der Reißfestigkeit.

Klinische Vergleichsdosen: 15 mg/die.

Spezifische Probleme der Zytostatikatherapie sowie die Wahl unterschiedlicher, schwer vergleichbarer Wundmodelle könnten die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse erklären:

1. Applikationsform:

Einen wichtigen Faktor stellt die Verabreichungsform dar, nämlich parenteral (i.v., i.p., s.c.) oder topisch, da hierdurch systemische und lokale Effekte bestimmt werden. Die unterschiedlichen Applikationsformen erschweren Dosisvergleiche.

2. Dosis:

Einige Zytostatika, wie Methotrexat, Cyclophosphamid und N-Lox (Nitrogen-Mustard) zeigen einen deutlich dosisabhängigen Effekt (9, 33, 14), so daß Untersuchungen, die differierende Dosen eines Zytostatikums anwenden, durchaus unterschiedliche Ergebnisse haben können.

3. Intervall zwischen Wundsetzung und Applikation des Zytostatikums:

Ein wichtiger Parameter scheint der Applikationszeitpunkt zu sein. Das trifft z.B. für Methotrexat zu, das nach Wundsetzung bis zum 3. postoperativen Tag verabreicht, den stärksten Effekt zeigt (9). Newcombe (93) fand eine Beeinträchtigung der Wundheilung durch Nitrogen-Mustard nur dann, wenn es am 3. Tag nach Wundsetzung verabreicht wurde.

4. Parameter zur Messung der Wundheilung:

Die meist angewandte Methode der Messung der Wundreißfestigkeit wurde erst mit Entwicklung moderner Geräte standardisiert, die zur schnellen Zerreißung des Gewebes führen. Eine zögernde Gewebstrennung führt wegen langsamer Zerreißung des Kollagens zu niedrigeren und variableren Ergebnissen (121).

5. Ort der Wundsetzung:

Eventuell besitzt die Wahl des Wundortes (meist die Rückenhaut, die vollständig durchtrennte Bauchwand, einschließlich Peritoneum oder der Darm) wegen einer unterschiedlichen Sensitivität des Gewebes Einfluß auf die Zytostatikawirkung (121).

6. Zeitpunkt der Messung:

Durch Zytostatika werden unterschiedliche Phasen der Wundheilung beeinträchtigt. So führt Cyclophosphamid (14) auch bei hoher Dosierung zu Wundheilungsstörungen erst vom 7. Tag an, mit einem Maximum am 21. Tag, während Methotrexat nur die frühen Phasen der Reparation stört und später gegenüber der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied mehr besteht. Eine Messung zum falschen Zeitpunkt würde deshalb zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im Tiermodell die meisten der untersuchten Zytostatika dosisabhängig und in oft deutlich über der klinischen Dosierung liegenden Applikationsmengen die Wundheilung beeinträchtigen, wie z.B. Methotrexat und Cyclophosphamid.

Jedoch scheinen einige Zytostatika kaum einen negativen Einfluß auf den Wundheilungsvorgang zu haben. 5-Fluorouracil ist hier zu nennen, das in einer sehr hohen Dosierung von 180 mg/kg/die die dermale Wundheilung bei Mäusen nicht stört (13).

Klinisch-adjuvante Studien über den Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung beim Menschen

Mrazek (90) veröffentlichte 1957 das erste Protokoll einer adjuvanten postoperativen Chemotherapie mit Thio-Tepa bei Mamma- und Colon-Karzinompatienten. Aus der großen Anzahl klinisch-adjuvanter Studien interessierten uns insbesondere die, bei welchen frühzeitig - vor Abschluß der Wundheilung - Zytostatika verabreicht wurden und die eventuell aufgetretenen Wundheilungsstörungen protokollierten.

Mit einer Ausnahme wurde bei keiner der adjuvanten Studien eine Beeinträchtigung der Wundheilung beobachtet. Zu einer höheren postoperativen Komplikationsrate kam es auch dann nicht, wenn das Zytostatikum sofort postoperativ verabreicht wurde. Die von Cohn et al. (16) 1968 in einer "National Surgical Adjuvant Breast-Project"-Studie beobachtete Erhöhung lokaler Komplikationsraten nach Operation von Mamma-Karzinom-Patientinnen unter 15 mg/kg/die 5-Fluorouracil vom siebten bis zehnten postoperativen Tag stellt eine Ausnahme dar. Zudem entstanden in dieser Studie auch bei der Kontrollgruppe in 43 % der Fälle Wundkomplikationen, gegen 52 % in dem chemotherapeutisch nachbehandelten Kollektiv.

Die relativ beschränkte Information über Wundheilungsstörungen in klinisch-adjuvanten Chemotherapieprotokollen hängt vor allem mit zwei Problemen zusammen: Die bei Malignompatienten sehr häufig auftretenden Wundheilungsstörungen unterliegen außer dem Faktor "adjuvante Chemotherapie" einer Vielzahl anderer Einflüsse wie Infektion, Blutverlust und Alter des Patienten. Dies bedingt die hohe Komplikationsrate in der Kontrollgruppe, wodurch eine statistische Signifikanz schwer zu belegen ist.

Tabelle 5: Wundheilungsstörungen unter perioperativer Zytostatikatherapie in klinischen Studien

Zytostatikum	Tumor	Einfluß auf Wundheilung	Dosis	Tag	Autor
Nitrogen-Mustard	Kolorektal	Ø	Instillation in den Darm	0	107
	Mamma		0,4 mg/kg	0-2	90
5-Fluorouracil	Kolorektal	Ø	Instillation in den Darm	0	108
	Mamma	ja	15 mg/kg	7-10	16
Thio-Tepa	Mamma	Ø	0,2-0,4 mg/kg	0-2	16, 36
	Kolorektal	Ø	0,2-0,4 mg/kg	0-2	27
	Magen	Ø	0,4 mg/kg i.v. und i.p.	0	74
	Mamma, Kolo- rektal	Ø	0,2 mg/kg	0-2	90
Cyclophosphamid	Mamma	Ø	30 mg/kg	0-5	95
	Mamma	Ø	2-3 mg/kg	-4 bis +5	35
Daktinomycin	Wilm's Tumor	Ø	75 µg/kg	1-5	34

Modifiziert nach Cohen (13)

Aus den Ergebnissen tierexperimenteller und klinisch-adjuvanter Studien folgert Graves (46) in einer Übersichtsarbeit, daß mit adjuvanter Chemotherapie abzuwarten sei, bis die Zeitspanne eines erhöhten postoperativen Komplikationsrisikos verstrichen sei (wobei diese Zeitspanne von der Schwere des chirurgischen Eingriffes abhängig wäre). Dagegen schließt Cohen (13) aus eigenen tierexperimentellen Arbeiten, daß perioperative Zytostatikagabe mit geringer Gefahr einer Wundheilungsstörung verbunden sei. Cohen folgert ferner aus eigenen Untersuchungen und den Arbeiten anderer Autoren, daß die perioperative Anwendung von Bleomycin, Actinomycin oder der Vincaalkaloide eher die Gefahr einer Wundheilungsstörung in sich berge als die Gabe von Methotrexat, 5-Fluorouracil oder Cyclophosphamid. Deshalb hält Cohen, bezugnehmend auf die Ergebnisse klinisch-adjuvanter Studien, eine weitere Erforschung und den Einsatz von Zytostatika in chirurgisch-adjuvanten Studien für gerechtfertigt.

Ebenso schließt Shamberger (121) aus den in seiner Arbeit gesammelten Ergebnissen zur tierexperimentellen und klinisch-adjuvanten Forschung über den Einfluß von Zytostatika auf die Wundheilung, daß eine perioperative Chemotherapie mit minimaler Morbidität verbunden sei, wenn die vorhandenen tierexperimentellen und klinisch-adjuvanten Daten beachtet würden.

Schlußbetrachtung

Es herrscht Übereinstimmung darüber, daß bei vielen malignen menschlichen Tumoren die Überlebensquoten nur anzuheben sind, wenn neue Behandlungsformen zur Anwendung kommen.

Besonders frühzeitig metastasierende Tumoren, wie das Melanom, lassen in vielen Fällen eine alleinige chirurgische

Tumorexstirpation als unbefriedigend erscheinen, weil selbst radikales lokales Vorgehen die häufig vorhandenen Mikrometastasen nicht erfassen kann. Die Annahme, in vielen Fällen eines scheinbar lokalisierten Melanoms mit einer systematisierten Erkrankung konfrontiert zu sein, führte zu mehreren Therapieansätzen. Eine "adjuvante" chirurgische Therapie stellt die obligate, nicht an den klinischen Metastasenverdacht gebundene Lymphknotendisektion dar. Bei relativ hoher Morbidität durch Lymphödem und Wundheilungsstörungen ist der Erfolg dieser Maßnahme fraglich (138, 141). Die Exstirpation nur sicher betroffener LK bringt offenbar keine Nachteile gegenüber der prophylaktischen Entfernung der den Primärtumorsitz drainierenden Lymphknotengruppe.

Einen weiteren Ansatzpunkt für eine multimodale Krebstherapie stellt die Immuntherapie dar, die sich bisher meist auf eine unspezifische Stimulation der körpereigenen Abwehr beschränkt (89). Während die intraläsionale Anwendung von BCG oder DNCB beim Melanom sicher Tumorregressionen zu initiieren vermag, ist die systemische BCG-Therapie nicht völlig unumstritten (83), kommt jedoch in Kombination mit DTIC in vielen klinisch-adjuvanten Studien zur Anwendung (137, 57).

Neben der bei anderen Tumorformen häufig, in der Melanomtherapie jedoch nur ausnahmsweise angewandten Strahlentherapie (im Falle zerebraler Metastasen), stellt die Zytostatikatherapie sicher die wichtigste adjuvante Behandlungsform dar. Das theoretische Ziel einer adjuvanten, frühzeitigen Chemotherapie ist die Vernichtung der letzten lebensfähigen Tumorzelle und damit die Heilung des Patienten. Dagegen müssen die negativen Auswirkungen der zytotoxischen Drogen abgewogen werden, die neben einer Schwächung der körpereigenen Abwehr, einer Verschlechterung der Lebensqualität des Tumorkranken sowie der Auslösung von Zweittumoren auch Wundheilungsstörungen einschließen.

Die von uns durchgeführte tierexperimentelle Studie an männlichen Albinoratten, die einen der klinischen Dosen (bzw.

der dreifachen) entsprechenden DTIC-Zyklus vom Tag der Wundsetzung bis zum 4. postoperativen Tag erhielten, zeigten unter dieser adjuvanten Chemotherapie keine Beeinträchtigung der Wundheilung, die wir mit dem Parameter "Granulationsgewebsbildung" maßen.

Dieses Ergebnis ordnet DTIC in die Reihe der Zytostatika wie Methotrexat, 5-Fluorouracil oder Cyclophosphamid ein, die in klinischen Dosen den Wundheilungsvorgang im Tierexperiment nicht oder nur vorübergehend beeinträchtigen (13). Geht man von einer grundsätzlichen Übertragbarkeit der Wundheilungsvorgänge bei Ratten auf die beim Menschen und einer Vergleichbarkeit der DTIC-Wirkung bei Tier und Mensch aus, spricht unsere Studie gegen einen postoperativen Aufschub der adjuvanten Chemotherapie um zwei bis drei Wochen.

Selbstverständlich kann eine unbeeinträchtigte Wundheilung nicht als einziges Kriterium einer vertretbaren, adjuvanten Chemotherapie gelten. Als wichtigster Maßstab erscheint die Erreichung des Therapieziels, nämlich die Vernichtung residualer Tumorzellen. Während bei Tumoren wie CLL (chronisch lymphatische Leukämie) und Osteosarkom Dauerheilungen bis zu 60 % erzielt werden (126), ist dieses Ziel beim malignen Melanom noch weit entfernt. Nach Garin (39) wäre eine Voraussetzung für die Verbesserung der Ergebnisse adjuvanter perioperativer Chemotherapie unter anderen, daß die verwendeten Zytostatika beim fortgeschrittenen Malignom in mindestens 50 % der Fälle Remissionen erzielten. Außerdem müßte die Selektion von Patienten mit hoher Metastasierungsgefahr von dem durch Chirurgie allein heilbaren Kollektiv anhand abgesicherter Kriterien möglich sein. Letzteres erscheint mit Hilfe des prognostischen Index im Rahmen der Melanomtherapie gesichert. Dagegen liegt DTIC mit einer Ansprechquote von 16 bis 33 % weit unter der von Garin postulierten 50 %-Marke. Ferner wäre die Durchführung von In vitro und In vivo Tests (39) wünschenswert, um Patienten, die primär Zytostatika-resistent sind, nicht einer nebenwirkungsreichen Therapie zu unterwerfen.

Die zunehmend aggressivere Tumorthherapie, die weniger palliativ als kurativ sein will, wirft die Frage von Wundheilungsstörungen durch adjuvante Chemotherapie im Rahmen von Primärtumorsektionen oder chirurgischer Metastasenbehandlung auf. Allgemein scheint die Gefahr einer Beeinträchtigung der Wundheilung durch Zytostatika eher zu hoch eingeschätzt zu werden, was in vielen adjuvanten Studien zu einem Intervall von zwei bis vier Wochen zwischen der Operation und dem ersten Chemotherapiezyklus führt. Keine der adjuvanten Studien jedoch (mit einer fraglichen Ausnahme), die am Operationstag mit der Applikation des Zytostatikums begannen, berichtet von vermehrten Wundheilungsstörungen gegenüber den Kontrollgruppen.

Das im Tiermodell postoperativ vom Operationstag an fünf Tage lang verabreichte DTIC zeigte keine Beeinträchtigung der Granulationsgewebsbildung als Parameter dermalen Wundheilung. Das Ergebnis legt nahe, daß die Verschiebung des ersten DTIC-Zyklus um mindestens zwei Wochen unnötig sein könnte. Ausgehend von der Theorie der adjuvanten Chemotherapie verspricht eine Zytostatikagabe mit dem Ziel der Vernichtung von Mikrometastasen den größten Erfolg bei möglichst frühzeitiger Verabreichung. Dieses Konzept braucht offenbar nicht wegen der Gefahr vermehrter Wundkomplikationen verlassen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

Der Einfluß des Zytostatikums DTIC auf die Wundheilung wurde an Ratten untersucht. Den Tieren wurden in standardisierte Wunden über den Processus spinale Polyvinylchlorid-Kammern implantiert, in denen sich ein Granulationsgewebe entwickelte, das als Parameter des dermalen Heilungsprozesses galt. DTIC hemmt in den klinischen Dosen äquivalenter (bzw. in dreifach höherer) Dosierung die Wundheilung in diesem Modell nicht. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint eine frühzeitige, postoperative DTIC-gabe im Rahmen der adjuvanten Melanombehandlung als ungefährlich im Hinblick auf eine Störung der Wundheilung.

LITERATURVERZEICHNIS

=====

1. Banzet, P. et al.: Adjuvant chemotherapy in the management of primary malignant melanoma.
Cancer 41, 1240 (1978)
2. Beretta, G.; Bajetta, E.; Bonadonna, G. et al.: Polichemioterapia con 5-(3,3 dimetil-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide (DTIC; NSC-45388), 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU; NSC-409962) e vincristina (NSC-67574) nel melanoma in fase metastatizzata.
Tumori 59, 239 (1973)
3. Bodenham, D.C.: A study of 650 observed malignant melanomas in the south-west region.
Ann. R. Coll. Surg 43, 218 (1968)
4. Bonadonna, G. et al.: Recent trends in the medical treatment of Hodgkin's disease.
Europ. J. Cancer 11, 251 (1975)
5. Bono Jr., V.H.: Studies on the mechanism of action of DTIC (NSC-45388).
Cancer Treat. Rep. 60, 141 (1976)
6. Braun-Falco, O.: Maligne Melanome der Haut aus dermatologischer Sicht.
Chirurg 45, 345 (1974)
7. Breslow, A.: Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.
Ann. Surg. 172, 902 (1970)
8. Burchenal, J.H.: Adjuvant therapy - theory, practice, and potential.
Cancer 37, 46 (1976)
9. Calnan, J.; Davies, A.: The effect of methotrexate (Amethopterin) on wound healing: An experimental study.
Br. J. Cancer 19, 505 (1965)

10. Campbell, R.C.: Statistische Methoden für Biologie und Medizin, S. 96-126. Thieme-Verlag, Stuttgart 1971
11. Chanda, J.J.: Malignant Melanoma and Its Therapy: a Review.
Cutis 23, 759 (1979)
12. Clark, W.H. Jr.; From, L.; Bernardino, E.A.; Mihm, M.C.: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin.
Cancer Res. 29, 705 (1969)
13. Cohen, S.C.; Gabelnick, H.L.; Johnson, R.K.; Goldin, A.: Effects of antineoplastic agents on wound healing in mice.
Surgery 78, 238 (1975)
14. Cohen, S.C.; Gabelnick, H.L.; Johnson, R.K.; Goldin, A.: Effects of cyclophosphamide and Adriamycin on the healing of surgical wounds in mice.
Cancer 36, 1277 (1975)
15. Cohen, S.M.; Greenspan, E.M.; Welner, M.J. et al.: Triple combination chemotherapy of disseminated melanoma.
Cancer 29, 1489 (1972)
16. Cohn, I. Jr.; Slack, N.H.; Fisher, B.: Complications and toxic manifestations of surgical adjuvant chemotherapy for breast cancer.
Surg. Gynecol. Obstet. 127, 1201 (1968)
17. Conn, J.H.; Leb, S.M.; Hardy, J.D.: Effect of nitrogen mustard and thio-TEPA on wound healing.
Surg. Forum 8, 80 (1957)
18. Constanza, M.E.; Nathanson, L.; Lenhard, R.; Wolter, J.; Colsky, J.; Oberfield, R.A. and Schilling, A.: Therapy of malignant melanoma with an imidazole carboxamide and bis-chloroethyl nitrosoures.
Cancer 30, 1457 (1972)

19. Costanzi, J.J.; Vaitkevicius, V.K.; Quagliana, J.M.
et al.: Combination chemotherapy for disseminated ma-
lignant melanoma.
Cancer 35, 342 (1975)
20. Cutler, S.J. et al.: Trends in survival rates of pa-
tients with cancer.
N. Engl. J. Med. 293, 122 (1975)
21. Desprez, J.D.; Klehn, C.L.: The effects of cytoxan
(cyclophosphamide) on wound healing.
Plastic Reconstr. Surg. 26, 301 (1960)
22. Devereux, D.F.; Thibault, L.; Boretos, J.; Brennan,
M.F.: The quantitative and qualitative impairment of
wound healing by Adriamycin.
Cancer 43, 932 (1979)
23. DeVita, V.: Natural History of Malignant Melanoma as Re-
lated to Therapy.
Cancer Treatm. Rep. 60, 153 (1976)
24. Dittrich, H.: Wundheilungsstörungen.
Der Chirurg 42, 289 (1971)
25. Dunphy, J.E. et al.: Wound healing, new perspective
with particular reference to ascorbic acid deficiency.
Ann. Surgery 114, 304 (1956)
26. Dunphy, J.E.; Jackson, D.S.: Practical applications of
experimental studies in the care of the primarily closed
wound.
Am. J. Surg. 104, 273 (1962)
27. Dwight, R.W.; Higgins, G.A. and Keehn, R.J.: Factors
influencing survival after resection of cancer of the
colon and rectum.
Am. J. Surg. 117, 512 (1969)
28. Eder, M.; Gedigk, P.: Lehrbuch der Allgemeinen Patholo-
gie und der Pathologischen Anatomie. Springer Verlag,
Berlin/Heidelberg/New York 1974

29. Edwards, L.C.; Pernokas, L.N.; Dunphy, J.E.: The use of a plastic sponge to sample regenerating tissue in healing wounds.
Surg. Gynecol. Obstet. 105, 303 (1957)
30. Einhorn, L.H.; Burgess, M.A.; Vallejos, C. et al.: Prognostic correlations and response to treatment in advanced metastatic malignant melanoma.
Cancer Res. 34, 1995 (1974)
31. Everall, J.D.; Dowd, P.M.: Diagnosis, Prognosis and Treatment of Melanoma.
The Lancet, Nummer 286 (1977)
32. Farhat, S.M.; Amer, N.S.; Weeks, D.S. et al.: Effect of mechlorethamine hydrochloride (nitrogen mustard) on healing of abdominal wounds.
Arch. Surg. 76, 749 (1958)
33. Farhat, S.M.; Miller, D.M. and Musselman, M.M.: Effect of triethylenethiophosphoramide (thio-TEPA) upon healing of abdominal wounds.
Arch. Surg. 78, 729 (1959)
34. Fernback, D.J. and Martyn, D.T.: Role of dactinomycin on the improved survival of children with Wilms' tumor.
JAMA 195, 1005 (1966)
35. Finney, R.: Adjuvant chemotherapy in the radical treatment of carcinoma of the breast. A clinical trial.
Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med. 111, 137 (1971)
36. Fisher, B.: Systemic chemotherapy as an adjuvant to surgery in the treatment of breast cancer.
Cancer 24, 1286 (1969)
37. Frei, E.: Selected Considerations Regarding Chemotherapy as Adjuvant in Cancer Treatment.
Cancer Chemoth. Rep. 50, 1 (1966)

38. Freireich, E.J.; Gehan, E.A.; Rall, D.P.; Schmidt, L.H. and Skipper, H.B.: Quantitative Comparison of Toxicity of Anticancer Agents in Mouse, Rat, Hamster, Dog, Monkey and Man.
Cancer Chemotherapy Rept. 50, 249 (1966)
39. Garin, A.M. and Lichinicer, M.R.: Methodological aspects of cancer chemotherapy after radical surgery.
Cancer Chemother. Rep. 58, 129 (1974)
40. Gericke, D.: Probleme der Krebsimmuntherapie.
Münch. med. Wschr. 119, 1497 (1977)
41. Gerner, R.E.; Moore, G.E. and Didolkar, M.S.: Chemotherapy of disseminated malignant melanoma with dimethyl triazeno imidazole carboxamide and dactinomycin.
Cancer 32, 756 (1973)
42. Gilman, A.; Goodman, S.: Drugs used in the chemotherapy of neoplastic disease, In: The Pharmacological basis of therapeutics. Mc Millan Company, New York 1956
43. Goldman, L.I.; Lowe, S.; Al-Saleem, T.: Effect of fluorouracil on intestinal anastomoses in the rat.
Arch. Surg 98, 303 (1969)
44. Goldsmith, M.A. et al.: Quantitative prediction of drug toxicity in small and large animals.
Cancer Research 35, 1354 (1975)
45. Gordon, J.A.; Smith, G.M.R. and Ellis, H.: The effect of cytotoxic drugs on the healing of peritoneal wounds in the rat.
Br. J. Cancer 21, 763 (1967)
46. Graves, G. et al.: Effect of chemotherapy on the wound healing of surgical wounds.
Clin. Bulletin 10, 144 (1980)

47. Handbook of Experimental Pharmacology, Bd. XXXVIII/2:
Antineoplastic and Immunosuppressive agents
oo TI LI: Triazenoimidazole derivatives, Chapter 56,
page 544-553. Springer Verlag Berlin/New York 1974
48. Handbook of Experimental Pharmacology, Bd. XXXVIII/1:
Antineoplastic and Immunosuppressive agents
Zubrod, C.G.: Agents of choice in neoplastic disease,
Chapter 1, Page 1-11. Springer Verlag Berlin/New York
1974
49. Hall, S.W.; Loo Ph.D.: Clinical pharmacology of syste-
mic chemotherapeutic agents in skin neoplasms.
Int. J. of Derm. 17, 659 (1978)
50. Hardesty, W.H.: The effect of cytotoxic drugs on wound
healing in rats.
Cancer Res. 18, 581 (1958)
51. Harris, F.L. and Thomas, C.G., Jr.: The effect of topi-
cal nitrogen mustard on wound healing.
Surg. Gynecol. Obstet. 112, 684 (1961)
52. Hayes, H.: A Review of Modern Concepts of Healing of
Cutaneous Wounds.
J. Dermat. Surg. Oncol. 3, 188 (1977)
53. Hegemann, G.: Der Wandel der Infektion in der Chirurgie..
Langenbecks Arch. klin. Chir. 304, 30 (1963)
54. Helte, J.-J.: Prognose anhand der Absterbekurve in Ab-
hängigkeit von Irritation, Wachstum und Oberflächenge-
stalt des Primärherdes.
Arch. Dermat. Forsch. 244, 200 (1972)
55. Hersh, E.M.; McBride, C.M.; Gschwind, C.: Local and
systemic Immunologic effects of perfusion therapy for m.M.
Surg. Gynecol. Abstct. 137, 461 (1973)
56. Hill, B.T.; Baserga, R.: The cell cycle and its signi-
ficance for cancer treatment.
Cancer Treat. Rev. 2, 159 (1975)
57. Hill, G.J. et al.: DTIC: surgical adjuvant study COG
PROTOCOL 7040.
Cancer 47, 2556 (1981)

58. Hill, G.J.; Metter, G.E.; Moss, S. et al.: DTIC therapy for melanoma: correlation of toxicity with response and longevity in 742 patients. (abstr.)
Proc. AACR 17, 244 (1976)
59. Hoppe, I.: Einfluß cytostatischer Substanzen auf Wunden.
Verh. Dtsche Ges. Inn. Med. 68, 259 (1962)
60. Housholder, G.E.; Loo, T.L.: Elevated urinary excretion of 4-aminimidazole-5-carboxamide in patients after intravenous injection of 4-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-5-carboxamide.
Life Sci. 8, 533 (1969)
61. Howes, E.L.; Sooy, J.W.; Harvey, S.C.: The healing of wounds as determined by their tensile strength.
JAMA 92, 42 (1929)
62. Hunt; Dunphy, J.E.: Fundamentals of wound management.
Appleton Century Crofts, New York 1979
63. Illig, L. und Paul, E.: Grundsätzliches zur Klinik und Histologie des malignen Melanoms.
Med. Welt 25, 1017 (1974)
64. Jungi, W.F.: Knochen- und Weichteilsarkome.
Schweiz. med. Wschr. 108, 1350 (1978)
65. Karakousis, C.P. et al.: Soft-tissue sarcoma. Trends in treatment.
New York State Journal of Medicine, 328 (1979)
66. Karppinen, V. and Myllärniemi, H.: Vascular reactions in healing laparotomy wound under cytostatic treatment.
Acta Chir. Scand. 136, 675 (1970)
67. Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie, Hrsg. Paul Kiemmerle, 3. Auflage, Urban & Schwarzenbeck, München/Berlin/Wien 1976
68. Knutson, C.D.; Hori, M.; Watson, F.R.: Melanoma of the head and neck. A review of eighty-seven cases.
Amer. J. Surg. 124, 543 (1972)

69. Kopf, A.W.; Bart, R.S. and Rodriguez-Sains, R.S.: Malignant melanoma: a review.
J. Dermatol. Surg. Oncol. 3, 41 (1977)
70. Korting, G.W.: Therapie des Melanoms.
Dt. med. Wochenschr. 91, 501 (1966)
71. Kovac, W.; Rudas, B.: Experimentell-histologische Untersuchungen über die Dynamik des Granulationsgewebes.
Virchows Arch. path. Anat. 333, 81 (1960)
72. Krementz, E.T.; Giddens, W.R.; Chapman, W.L.: Effects of triethylenemelamine on wound healing.
Surg. Forum 8, 83 (1957)
73. Lindner, J. and Huber, P.: Biochemische und morphologische Grundlagen der Wundheilung und ihrer Beeinflussung.
Med. Welt 24, 897 (1973)
74. Longmire, W.P. Jr.; Kuzma, J.W. and Dixon, W.J.: The use of triethylenethiophosphoramide as an adjuvant to the surgical treatment of gastric carcinoma.
Ann. Surg. 167, 293 (1968)
75. Loo, T.L.; Luce, J.K.; Jardine, J.H., Frei, E.: III. Pharmacologic studies of the antitumor agent 5-(dimethyltriazeno)imidazole-4-carboxamide.
Cancer Res. 28, 2448 (1968a)
76. Loo, T.L.; Tanner, B.B.; Housholder, G.E.; Shepard, B.J.: Some pharmacokinetic aspects of 5-(dimethyltriazeno)imidazole-4-carboxamide in the dog.
J. pharm. Sci. 57, 2126 (1968b)
77. Loo, T.L. et al.: Mechanism of action and pharmacology studies with DTIC (NSC-45388).
Cancer Treat. Rep. 60, 149 (1976)
78. Luce, J.K.: Chemotherapy of malignant melanoma.
Cancer 30, 1604 (1972)

79. Luce, J.K.; McBride, C.M. and Frei, E.: Melanoma.
In: Holland, J.F. and Frei E. eds. Cancer Medicine
Philadelphia, Lea & Febiger, 1973, pp. 1823-1843
80. Luce, J.K.,; Torin, L.B. and Price, H.: Combination di-
methyl triazeno imidazole carboxamide (NSC-45388; DIC),
vincristine (NSC-67574; VCR) and 1,3-bis(2-chloroethyl)-
-1-nitrosourea (NSC-409962; BCNU) chemotherapy of dis-
seminated malignant melanoma.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 11, 50 (1970)
81. Madden, J.W.; Peacock, E.E. Jr.: Measurement of the rate
of collagen synthesis in sutured rat wounds.
Surg. Forum 18, 56 (1967)
82. Mann, M.; Bednar, B.; Felt, J.: Effect of cyclophos-
phamide on the course of cutaneous wound healing.
Neoplasma 24, 487 (1977)
83. McIlmurray, M.B.; Embleton, M.J.; Reeves, W.G.; Lang-
man, M.J.S.; Deane, M.: Controlled trial of active im-
munotherapy in management of stage IIB malignant mela-
noma.
Br. Med. Journ. 1, 540 (1977)
84. McLeod, R.R.; Beardmore, G.L.; Little, J.H.; Quinn,
R.L. and Davis, N.C.: Results of treatment of 361 pa-
tients with malignant melanome in Queensland.
Med. J. Aust. 1, 1211 (1971)
85. Montgomery, J.A.: Experimental studies at Southern Re-
search Institute with DTIC.
Cancer Treatm. Rep. 60, 125 (1976)
86. Moon, J.H.; Gailani, S.; Cooper, R.M. et al.: Compari-
sion of 1,3-BIS(2-chloroethyl)1-nitrosourea (BCNU) and
vincristine with two-dose schedules of DTIC in the
treatment of disseminated malignant melanoma.
Cancer 35, 368 (1975)

87. Moon, J.H.: Combination chemotherapy of malignant melanoma.
Cancer 26, 468 (1970)
88. Morris, T.; Lincoln, F.; Lee, A.: The effect of 5-fluorouracil on abdominal wound healing in rats.
Aust. NZ J. Surg. 48, 219 (1978)
89. Morton, D.L.; Eilber, F.R.; Holmes, E.C. et al.: Present status of BCG Immunotherapy of malignant melanoma.
Cancer Immunol. Immunother. 1, 93 (1976)
90. Mrazek, R.; Economou, S.; McDonald, G.O.; Slaughter, D.P.; Cole W.H.: Prophylactic and adjuvant use of nitrogen mustard in the surgical treatment of cancer.
Ann. Surg. 150, 745 (1959)
91. Myllärniemi, H. and Peltokallio, P.: The effect of high dose cyclophosphamide therapy in the abdominal cavity of the rat: Adhesions and their vascular pattern.
Ann. Chir. Gynaecol. Fenn. 63, 238 (1974)
92. Nathanson, L.; Wolter, J.; Horton, J. et al.: Characteristics of prognosis and response to an imidazole carb-oxamide in malignant melanoma.
Clin. Pharmacol. Ther. 12, 955 (1971)
93. Newcombe, F.J.: Effect on intra-arterial nitrogen mustard infusion on wound healing in rabbits: Formation of granulation tissue and wound contraction.
Ann. Surg. 163, 319 (1966)
94. Nicolini, A.; Cavalli, M.; Missiroli, A.; Goldin, A.: Immunogenicity induced in vitro by DIC in relatively non-immunogenic leukemias.
Europ. J. Cancer 13, 235 (1977)
95. Nissen-Meyer, R.; Kjellgren, K. and Masson, B.: Preliminary report from the Scandinavian Adjuvant Chemotherapy Study Group.
Cancer Chemother. Rep. 55, 561 (1971)

96. Paolucci, R.; Zanono, F.; Azzarelli, A.: L'Azione della chemioterapia sui processi di cicatrizzazione.
Tumori 61, 441 (1975)
97. Parsons, P.G. and Brown, S.G.: Cytotoxicity studies of human melanoma cells and fibroblasts.
AJEBAK 57, 161 (1979)
98. Peter H.H. et al.: Das maligne Melanom aus onkologisch-chirurgischer Sicht.
Therapiewoche 29, 5410 (1979)
99. Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie, Hrsg. Füllgraff G. und Palm D., 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1977
100. Pisesky, W.; Williams, H.T.G. and MacKenzie, W.C.:
The effect of triethylenethiophosphoramide (Thio-TEPA) and 17-ethyl-19-nortestosterone (Nivelar) on wound healing.
Can. J. Surg. 2, 291 (1959)
101. Pollack, S.V.: Wound healing: Biology of wound healing.
J. Dermatol. Surg. Oncol. 5, 389 (1979)
102. Pollack, S.V.: Wound healing: a review of environmental factors affecting wound healing.
J. Dermatol. Surg. Oncol. 5, 477 (1979)
103. Preussmann, R.; von Hodenberg, A.: Mechanism of carcinogenesis with 1-aryl-3,3-dialkyltriazenes - II. In vitro alkylation of guanosine, RNA and DNA with aryl-mono-alkyltriazenes to form 7-alkyl-guanine.
Biochem. Pharmacol. 19, 1505 (1970)
104. Raju, D.R.; Jindrak, K.; Weiner M. et al.: A study of the critical bacterial inoculum to cause a stimulus to wound healing.
Surg. Gynecol. Obstet. 144, 347 (1977)
105. Rath, H. and Enquist, I.F.: The effect of thio-TEPA on wound healing.
Arch. Surg. 79, 812 (1959)

106. Rieche, K.: Der derzeitige Stand der Immuntherapie von menschlichen Tumoren.
Arch. Geschwulstforsch. 44, 161 (1974)
107. Rousselot, L.M.; Cole, D.R.; Grossi, C.E.; Conte A.J.; Gonzalez, E.M.: Intraluminal chemotherapy (HN2 or 5-FU) adjuvant to operation for cancer of the colon and rectum. II. Follow-up report of 97 cases.
Cancer 20, 829 (1967)
108. Rousselot, L.M.; Cole, D.R.; Grossi, C.E. et al.: Adjuvant chemotherapy with 5-Fluorouracil in surgery for colo-rectal cancer: Eight-year progress report.
Dis. Colon Rectum 15, 169 (1972)
109. Rosenberg, S.A.: Surgical Treatment of Malignant Melanoma.
Cancer Treat. Rep. 60, 159 (1976)
110. Rudas, B.: Zur quantitativen Bestimmung von Granulationsgewebe in experimentell erzeugten Wunden.
Arzneimittelforsch. 10, 226 (1960)
111. Runne, U. et al.: Budd-Chiari-Syndrom unter Dacarbazin.
Dtsch. med. Wschr. 105, 230 (1980)
112. Ryan, G.B.; Cliff, W.J.; Gabbiani, G. et al.: Myofibroblasts in human granulation tissue.
Hum. Pathol. 5, 55 (1974)
113. Saunders, P.P.; Ph.D. and Lian-Yu Chao: Relevance of dimethylamine to mechanism studies of DIC (DTIC, NSC 45388).
Medical and Pediatric Oncology 2, 253 (1976)
114. Sauders, P.P. and Schultz, G.A.: Studies of the mechanism of action of the antitumor agent 5(4)-(3,3-di-methyl-1-triazeno) imidazole-4(5)-carboxamide in *Bacillus subtilis*.
Biochem. Pharmacol. 19, 911 (1970)

115. Selye, H.: Use of "Granuloma Pouch" technic in the study of antiphlogistic corticoids.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 82, 328 (1953)
116. Schabel, F.M. Jr.: The use of tumor growth kinetics in planning "curative" chemotherapy of advanced solid tumors.
Cancer Res. 29, 2384 (1969)
117. Schabel, F.M. Jr.: Concepts for treatment of micrometastases developed in murine systems.
Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med. 126, 500 (1976)
118. Schmährl, D.: Experimentelle Grundlagen der Tumormetastasierung, in: Krebs und Krebsbekämpfung, Bd. 6.
Urban & Schwarzenberg, München/Berlin/Wien 1967
119. Schmidt, C.G.: Basisprinzipien und klinische Pharmakologie der zytostatischen Behandlung.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 86, 337 (1980)
120. Schmoeckel, Ch.; Braun-Falco, O.: Prognostic index in malignant melanoma.
Arch. Dermatol. 114, 871 (1978)
121. Shamberger, R.C.; Devereux, D.F. and Brennan, M.F.: The Effect of Chemotherapeutic Agents on Wound Healing.
International Advances in Surgical Oncology 4, 15 (1981)
122. Shealy, Y.F.; Struck, R.F.; Holum, L.B.; Montgomery, J.A.: Synthesis of potential anticancer agent. XXIX. 5-Diazoimidazole-4-carboxamide and 5-diazo-*v*-triazole-4-carboxamide.
J. org. Chem. 26, 2396 (1961)
123. Shealy, Y.F.; Krauth, C.A.; Montgomery, J.A.: Imidazoles. I. Coupling reactions of 5-diazoimidazole-4-carboxamide.
J. org. Chem. 27, 2150 (1962b)

124. Shealy, Y.F.; Krauth, C.A.: Imidazoles. II. 5(or 4)-(monosubstituted triazeno)imidazole-4(or 5)-carboxamides.
J. med. Chem. 9, 34 (1966a)
125. Shirakawa, S.; Luce, J.K.; Iannock, I und Frei, E.: Cell proliferation in human melanoma.
J. clin. Invest. 49, 1188 (1970)
126. Silver, T.R. et al.: Some New Aspects of Modern Cancer Chemotherapy.
Am. J. of Med. 63, 772 (1977)
127. Skibba, J.L. and Bryan, G.T.: Effects of 4(5)-(3,3-Dimethyl-1-triazeno)-imidazole-5(4)-carboxamide (NSC 45388) in proliferating rat tissues.
Biochem. Pharmacology 21, 2817 (1972)
128. Skibba, J.L.; Bryan, G.T.: Methylation of nucleic acids and urinary excretion of ¹⁴C-labeled 7-methyl-guanine by rats and man after administration of 4(5)-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-5(4)-carboxamide.
Toxicol. appl. Pharmacol. 18, 707 (1971)
129. Skibba, J.L.; Ertürk, E.; Bryan, G.T.: Induction of thymic lymphosarcoma and mammary adenocarcinomas in rats by oral administration of the antitumor agent 4(5)-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-5(4)-carboxamide.
Cancer 26, 1000 (1970c)
130. Sutherland, C.M. and Kremenz, E.T.: Hepatic toxicity of DTIC.
Cancer Treat. Rep. 65, 321 (1981)
131. Staley, C.J.; Trippel, O.H.; Preston, F.W.: Influence of 3-fluorouracil on wound healing.
Surgery 49, 450 (1961).

132. Storck, H.: Zur Klinik und Therapie des malignen Melanoms.
Hautarzt 21, 187 (1970)
133. Taubenhaus, M. and Amromin, G.D.: Influence of steroid hormones on granulation tissue.
Endocrinology 44, 359 (1949)
134. Tenorio, A.; Jindrak, K.; Weiner, M. et al.: Accelerated healing in infected wounds.
Surg. Gynecol. Obstet. 142, 537 (1976)
135. The Laboratory Rat, Ed. by Henry J. Baker et al.,
New York. Acad. Press, 1979
136. Überla, K.: Biomathematik, S. 90-94, München: Publ. des Instituts für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Universität München, 1974
137. Veronesi, U. et al.: A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy of cutaneous melanoma.
New Engl. J. of Med. 307, 913 (1982)
138. Veronesi, U. et al.: Inefficacy of immediate node dissection in Stage I melanoma of the limbs.
N. Engl. J. Med. 297, 627 (1977)
139. Wagner, D.E.; Ramirez, G.; Weiss, A.J. et al.: Combination phase I-II study of imidazole carboxamide (NSC-45388).
Oncology 26, 310 (1971)
140. Wagner, K.: Derzeitiger Stand der Diagnose und Therapie der Lymphogranulomatose (Lg) (Diagnosis and therapy of Hodgkin's disease today).
Öster. Z. Onkologie 4, 93 (1977)
141. Wanebo, H.J.; Woodruff, J.; Fortner, J.G.: Malignant melanoma of the extremities: A clinicopathologic study using levels of invasion (microstage).
Cancer 35, 666 (1975)

142. Wilcox, W.S.: The last surviving cancer cell - The chances of killing it.
Cancer Chemother. Rep. 50, 541 (1966)
143. Wood, W.C. et al.: Randomized trial of adjuvant therapy for "high-risk" primary malignant melanoma.
Surgery 83, 677 (1978)

LEBENS LAUF

Ich, Ute Nixdorf, wurde am 17.10.1954 als zweites Kind des Diplom-Ingenieurs Werner Nixdorf und der Lieselotte Nixdorf, geb. Richter, in Reichenbach, Oberlausitz geboren.

Nach Beendigung der Grundschulzeit in Wolfenbüttel und Hamburg wechselte ich noch in Hamburg auf das neusprachliche Gymnasium und besuchte ab dem 12. Lebensjahr das Münchner Thomas-Mann-Gymnasium. Dort legte ich 1974 mit einem Gesamtdurchschnitt von 1,2 das Abitur ab. Im Wintersemester 1974 begann ich an der LMU-München das Medizinstudium, gefördert über die gesamte Studiendauer durch ein Hundhammer-Stipendium des bayerischen Staates. Am 7. April 1981 bestand ich den schriftlichen Teil des dritten Staatsexamens mit dem Ergebnis von 88,3 % richtig beantworteter Fragen und erhielt am 7. Mai 1981 nach Ablegung der mündlichen Prüfung die Approbation als Arzt.

Noch während des Praktischen Jahres begann ich die Tierexperimente im Rahmen meiner Doktorarbeit, deren Thema "Tierexperimentelle Untersuchungen zur Beeinflussung der Wundheilung durch DTIC" mir an der Dermatologischen Klinik der LMU-München von Prof. Dr. Braun-Falco überlassen wurde.

Nach Abschluß des experimentellen Teils meiner Dissertation nutzte ich die letzte Möglichkeit für einen längeren Auslandsaufenthalt und reiste durch Afrika und Südamerika.

Seit November 1982 vertrat ich während der Gesamtdauer eines Jahres niedergelassene Ärzte im bayerischen Raum und sammelte dabei erste praktische Erfahrungen bei der Versorgung ambulanter Patienten und im Notfalldienst. Gleichzeitig legte ich das ECMFG-Examen dieses Sommers ab und beendete den schriftlichen Teil meiner Doktorarbeit.

Am Schluß dieser Arbeit sei es mir gestattet, Herrn Prof. Dr. med. Otto Braun-Falco für die Überlassung des Themas und Herrn Privatdozent Dr. med. Michael Dorn für die stets freundliche Beratung bei der Durchführung meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern im Tierstall der Dermatologischen Klinik für die Mithilfe bei den Versuchen bedanken.

